



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

**Resistencia a carbapenemes mediada por
metalo- β -lactamasas en bacilos Gram-negativos No Fermentadores:
plataformas genéticas responsables de su diseminación**

Marco Alcides Brovedan

Rosario, Argentina

2019

**Resistencia a carbapenemes mediada por
metalo- β -lactamasas en bacilos Gram-negativos No Fermentadores:
plataformas genéticas responsables de su diseminación**

Marco Alcides Brovedan

Licenciado en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Mecanismos de Resistencia Bacteriana a Antimicrobianos del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre abril 2014 y marzo 2019 bajo la dirección de la Dra. Adriana Limansky y la co-dirección de la Dra. Patricia Marchiaro.

Dra. Adriana Limansky:.....

Dra. Patricia Marchiaro:.....

Jurado 1:

Jurado 2:

Jurado 3:

Defendido:

Principalmente a la Dra. Adriana S. Limansky por haberme guiado con entusiasmo, dedicación y afecto durante estos años de aprendizaje. Por su enorme predisposición y pasión por la ciencia. Gracias por haberme permitido formar parte de este grupo.

A la Dra. Patricia Marchiaro por el permanente e inestimable apoyo brindado. Por su amabilidad y cariño constante.

Al Dr. Alejandro Viale por haberme brindado la oportunidad de formar parte de este laboratorio.

A la Universidad pública, a CONICET y al IBR por brindarme el espacio físico para realizar esta Tesis doctoral.

A mis compañeras de laboratorio, Marcela y Rocío, gracias por los esfuerzos compartidos. Gracias por brindarse en todo momento y por sus auténticos consejos.

A Guillermo y Jorgelina, por su valiosa contribución a mi trabajo de formación.

A todos mis compañeros del CUASI. Por las charlas y cervezas compartidas.

A toda mi familia, principalmente a mis padres y hermanos por cuidarme, acompañarme y apoyarme. Sin ellos no habría podido recorrer este camino.

A mis amigos de toda la vida por haberme apoyado siempre en todas mis decisiones.

A Noelia por su cariño, paciencia y ayuda. Gracias por tu apoyo y confianza en mí.

Y a mi queridísimo hijo Mateo porque desde que llegó al mundo me ha enseñarme que la felicidad existe.

Parte de los resultados que se describen en el presente Trabajo de Tesis han sido publicados en las siguientes revistas y reuniones científicas:

Trabajos publicados

- ✓ **Brovedan M**, Marchiaro P, Morán-Barrio J, Cameranesi M, Cera G, Rinaudo M, Viale A, Limansky A. "Complete sequence of a *bla*_{NDM-1}-harboring plasmid in an *Acinetobacter bereziniae* clinical strain isolated in Argentina." *Antimicrob. Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.00367-15. **2015**.
- ✓ **Brovedan M**, Marchiaro P, Morán-Barrio J, Revale S, Cameranesi M, Brambilla L, Viale A, Limansky A. "Draft genome sequence of *Acinetobacter bereziniae* HPC229, a carbapenem-resistant clinical strain harboring *bla*_{NDM-1} from Argentina" *Genome Announc* 4(2):e00117-16. doi:10.1128/genomeA.00117-16. **2016**.

Trabajo en revisión

- ✓ **Brovedan M**, Repizo G, Marchiaro P, Viale A, Limansky A. "The plasmid diversity of *Acinetobacter bereziniae* HPC229 provides clues on the ability of the species to thrive on both clinical and environmental habitats" *Front. Microbiol.*

Presentaciones a reuniones científicas

- ✓ **Brovedan M**, Marchiaro P, Díaz S, Pasteran F, Morán-Barrio J, Viale A, Limansky A. **(2014)**. "Group *Pseudomonas putida*: a silent environmental reservoir of antimicrobial resistance genes" Congreso Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Rosario, Argentina.
- ✓ **Brovedan M**, Marchiaro P, Morán-Barrio J, Brambilla L, Cera G, Rinaudo M, Viale AM, Limansky A. **(2015)**. "First report of a plasmid harboring *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter bereziniae* clinical isolate from Argentina". 10th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*. Atenas, Grecia.
- ✓ **Brovedan M**, Marchiaro P, Morán-Barrio J, Brambilla L, Cera G, Rinaudo M, Viale AM, Limansky A. **(2015)**. "Evolution of a novel plasmid-borne genetic platform carrying *bla*_{NDM-1} in a carbapenem-resistance *Acinetobacter bereziniae* clinical strain isolated in Rosario." XI Congreso Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE). Cordoba, Argentina.
- ✓ **Brovedan M**, Marchiaro P, Morán-Barrio J, Viale AM, Limansky A. **(2015)**. "Whole-genome sequencing analysis of a carbapenem-resistant *Acinetobacter bereziniae* clinical strain". SAIB. Mar del Plata, Argentina.
- ✓ **Brovedan M**, Marchiaro P, Diaz S, Rinaudo M, Ballerini V, Moran-Barrio J, Pasteran F, Corso A, Viale A, Limansky A. **(2016)**. "Diseminación de *bla*_{VIM-2} mediada por transposones tipo-Tn402 en aislamientos clínicos de *Pseudomonas* spp." Asociación Latinoamericana de Microbiología (ALAM). Rosario, Argentina.

- ✓ **Brovedan M**, Repizo G., Espariz M., Marchiaro P, Viale A.M., Limansky A. (2017). "Comparative genomic analysis of *Acinetobacter bereziniae* strains revealed an overall proximity between two geographically-separated carbapenem-resistant strains containing plasmids bearing *bla_{NDM-1}*". 11th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*. Sevilla, España.
- ✓ **Brovedan M**, Repizo G., Espariz M., Marchiaro P, Viale A.M., Limansky A. (2018). "Análisis de genómica comparativa muestra un clado de cepas portadoras de genes con implicancia clínica en la especie ambiental *A. bereziniae*". XVIII Jornadas Argentina de Microbiología (JAM). Rosario, Argentina,
- ✓ **Brovedan M**, Repizo G., Marchiaro P, Viale A.M., Limansky A. (2018) "Plasmid diversity in an *Acinetobacter bereziniae* clinical strain, HPC229: antimicrobial and heavy metal resistance genes, different replicases, and XerC/D-flanked modules contribute to the adaptability to different habitats and to the *Acinetobacter* plasmidome". Seattle, Estados Unidos.

Índice

Índice	<i>i</i>
Abreviaturas	<i>vi</i>
Resumen	<i>viii</i>
I. Introducción general	1
I.1. Infecciones nosocomiales y resistencia bacteriana a los antibióticos: hito de la medicina moderna	1
I.2. Antibióticos β -lactámicos	1
I.3. Mecanismos de resistencia a β -lactámicos	3
I.3.1. β -lactamasas	4
I.3.1.1. Mecanismo de resistencia enzimático a carbapenemes en BGN: carbapenemasas	6
I.3.1.1.1. Carbapenemasas de clase A y D: S β LS	8
I.3.1.1.2. Carbapenemasas de clase B: M β LS	11
I.3.1.1.2.1. Relevancia clínica de las M β LS adquiridas	14
I.3.1.1.2.2. Epidemiología de las M β LS	15
I.3.1.1.2.3. Emergencia de Bacilos no Fermentadores portadores de M β LS	19
I.4. Mecanismos de diseminación de genes de resistencia en BGN	20
I.4.1. Estructuras genéticas que participan en la movilización de genes de resistencia dentro de la célula	21
I.4.1.1. Secuencias de inserción y transposones	21
I.4.1.1.1. ISCR y transposones asociados a la diseminación de M β LS en BGN	23
I.4.1.1.1.1. Diseminación de <i>bla</i> _{NDM-1} a través del transposón compuesto Tn125	24
I.4.1.2. Integrones	26
I.4.1.2.1. Implicancia clínica de integrones de clase 1 con casetes de genes de resistencia	28
I.4.1.2.2. Evolución y diversidad de integrones clase 1	30
I.4.1.2.2.1. Ancestro de integrones de clase 1: transposón Tn402	31
I.4.1.2.2.2. Integrones de clase 1 inusuales	32
I.4.1.3. Islas genómicas en BGN	33
I.4.2. EGM involucrados en la diseminación de genes entre células	34
I.4.2.1. Plásmidos	34
I.4.2.1.1. Estructura funcional de los plásmidos	34
I.4.2.1.1.1. Implicancia de los sitios XerC/D en la formación de módulos transferibles	37
I.4.2.1.2. Plásmidos conjugativos y movilizables	38

I.4.2.1.3. Clasificación de los plásmidos	40
I.5. Rol de los ambientes naturales en la evolución de la resistencia de bacterias patógenas	43
I.6. Objetivos de esta Tesis Doctoral	46
I.6.1. Objetivos Generales	46
I.6.2. Objetivos Específicos	46
 II. Materiales y Métodos	 48
II.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo	48
II.2. Caracterización fenotípica de las cepas	48
II.2.1. Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos	48
II.2.2. Ensayo de Sinergia: inhibición con EDTA para detectar MβLs	48
II.3. Técnicas de Biología Molecular	49
II.3.1. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico	49
II.3.2. Aislamiento y purificación de ADN genómico	49
II.3.3. Determinación de la concentración y pureza de ácidos nucleicos	49
II.3.4. Ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	49
II.3.4.1. PCR específica	49
II.3.4.2. PCR empleando oligonucleótidos degenerados (OD-PCR) para “fingerprinting”	51
II.3.4.3. PCR inversa	51
II.3.5. Electroforesis en geles de agarosa	52
II.3.5.1. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	52
II.3.6. Digestión de ADN con enzimas de restricción	53
II.3.7. Clonado de fragmentos a partir de extracción genómica. Digestión con enzimas de restricción y ligación	53
II.3.8. Detección de <i>bla</i> _{VIM-2} mediante “Southern blot”	53
II.3.8.1. Electroforesis en campo pulsado o PFGE (“pulsed field gel electrophoresis”)	53
II.3.8.2. Transferencia de ADN a membrana	54
II.3.8.3. Hibridización y detección de marca biotinilada	55
II.4. Técnicas genéticas de transferencia de ADN	55
II.4.1. Transformación de <i>E. coli</i>	55
II.4.2. Transformación de <i>Acinetobacter</i> sp.	56
II.4.3. Ensayos de conjugación	56
II.4.3.1. Conjugación bipartita empleando <i>E. coli</i> DH5α o <i>P. aeruginosa</i> PAO1 como aceptoras	56

II.4.3.2. Conjunción tripartita empleando <i>E. coli</i> DH5 α como aceptora y <i>E. coli</i> HB101 como dadora del plásmido “helper”	57
II.4.4. Técnica de curado de plásmidos	57
II.5. Identificación taxonómica de los aislamientos clínicos incluidos en este trabajo	58
II.5.1. Caracterización de aislamientos de <i>P. grupo putida</i> basada en espectrometría de masa	58
II.5.2. Caracterización de los aislamientos de <i>P. grupo putida</i> basada en MLSA	58
II.6. Secuenciación de ADN	60
II.6.1. Secuenciación por el método de Sanger	60
II.6.2. Secuenciación completa de ADN genómico y ADN plasmídico	60
II.7. Herramientas bioinformáticas	61
II.7.1. Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas	61
II.7.2. Predicción de CDS (“coding sequences”) y de marcadores plasmídicos	61
II.7.3. Identificación y alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas. Marcadores plasmídicos e iterones	61
II.7.4. Contenido G+C, “GC skew” y origen de replicación de los plásmidos de <i>A. bereziniae</i> HPC229. Análisis comparativo de los plásmidos contra genomas de <i>A. bereziniae</i> .	62
II.7.5. Identificación de genes de resistencia, transportadores de membrana y fagos	62
II.7.6. Identificación de secuencias de inserción y registro de transposones	63
II.7.7. Identificación de sitios XerC/D en los plásmidos de <i>A. bereziniae</i> HPC229	63
II.7.8. Cálculo del parámetro orthoANI (por “orthology Average Nucleotide Identity”)	63
II.7.9. Clasificación de los plásmidos de <i>A. bereziniae</i> HPC229	64
II.7.9.1. Clasificación basada en la comparación de las secuencias de las replicasas	64
II.7.9.2. Clasificación basada en análisis filogenético de las secuencias de relaxasas	64
III.1. Capítulo 1. Diseminación de <i>bla</i>_{VIM-2} mediada por transposones tipo-Tn402 en aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas</i> spp.	66
III.1.1. Introducción	66
III.1.2. Resultados y Discusión	72
III.1.2.1. Caracterización taxonómica de aislamientos de <i>P. grupo putida</i> portadoras de <i>bla</i> _{VIM-2}	72
III.1.2.2. Plataformas portadoras de <i>bla</i> _{VIM-2} en aislamientos clínicos locales de <i>P. grupo putida</i> : caracterización molecular y eventos involucrados en su diseminación	79
III.1.2.2.1. Caracterización de integrones/transposones InT7633 e InT7133. Nomenclatura internacional	79
III.1.2.2.2. Caracterización de la plataforma portadora de <i>bla</i> _{VIM-2} en <i>P. monteilii</i> HB157	81

III.1.2.2.2.1. Caracterización de la cepa clínica <i>P. monteilii</i> HB157 productora de VIM-2	82
III.1.2.2.2.2. Caracterización de la plataforma genética portadora de <i>bla</i> _{VIM-2} en HB157	83
III.1.2.2.3 Transposones tipo-Tn402 en <i>Pseudomonas</i> spp.	88
III.1.2.3. Caracterización de los plásmidos portadores de <i>bla</i> _{VIM-2} en <i>P. grupo putida</i>	90
III.1.2.4. Plataforma portadora de <i>bla</i> _{VIM-2} en una cepa local MR de <i>P. aeruginosa</i>	95
III.1.2.5. Determinación de la localización genómica de las plataformas portadoras de <i>bla</i> _{VIM-2}	99
III.1.2.6. Sitio de inserción del Tn6335 en cromosoma de cepas locales bajo estudio	106
III.1.2.7. Modelo de diseminación del Tn6335 y Tn6336 en <i>Pseudomonas</i> spp.	109
 III.2. Capítulo 2. Caracterización genética de plásmidos de la cepa clínica <i>Acinetobacter bereziniae</i> HPC229	 115
III.2.1. Introducción	115
III.2.1.1. Plataformas genéticas portadoras de <i>bla</i> _{NDM-1} en <i>Acinetobacter bereziniae</i>	115
III.2.1.2. Plásmidos co-residentes, carentes de marcadores de resistencia a antimicrobianos, en <i>Acinetobacter bereziniae</i> HPC229	117
III.2.1.3. Organización genética de los plásmidos de <i>A. bereziniae</i> HPC229	118
III.2.2. Resultados y Discusión	120
III.2.2.1. Plataformas genéticas portadoras de genes codificantes de MβLs en <i>Acinetobacter bereziniae</i>	120
III.2.2.2. Identificación de <i>A. bereziniae</i> HPC229 basada en marcadores moleculares	121
III.2.2.3. Estudio de la plataforma genética responsable de la diseminación de <i>bla</i> _{NDM-1}	122
III.2.2.3.1. Caracterización del gen codificante de la MβL	123
III.2.2.3.2. Caracterización del entorno genético inmediato de <i>bla</i> _{NDM-1}	123
III.2.2.3.3. Localización del gen codificante de NDM	124
III.2.2.3.3.1. Evidencias de localización plasmídica de <i>bla</i> _{NDM-1}	124
III.2.2.3.3.2. Confirmación de localización plasmídica de <i>bla</i> _{NDM-1}	126
III.2.2.3.4. Análisis plasmídico de HPC229 <i>in silico</i>	128
III.2.2.3.4.1. Análisis de la secuencia del plásmido portador de <i>bla</i> _{NDM-1}	128
III.2.2.3.4.2. Caracterización de pNDM229	130
III.2.2.3.4.3. Análisis comparativo de plásmidos portadores de <i>bla</i> _{NDM-1}	134
III.2.2.4. Caracterización del contenido plasmídico de <i>Acinetobacter bereziniae</i> HPC229	148
III.2.2.4.1. Identificación de plásmidos por métodos experimentales	148
III.2.2.4.2. Análisis de secuencia y ensamblado de plásmidos de HPC229	149
III.2.2.4.3. Organización y caracterización de plásmidos presentes en HPC229	151
III.2.2.4.3.1. Caracterización de pAbe229-114	153

III.2.2.4.3.1.1. Elementos genéticos móviles (o movilizables) presentes en pAbe229-114	157
III.2.2.4.3.2. Caracterización de los plásmidos pAbe229-15 y pAbe229-9	160
III.2.2.4.3.3. Caracterización de los plásmidos pAbe229-4 y pAbe229-1	163
III.2.2.4.3.4. Evaluación comparativa de plásmidos de HPC229 contra <i>Acinetobacter</i> spp.	165
III.2.2.4.3.4.1. Evaluación comparativa de plásmidos de HPC229 contra <i>Acinetobacter</i> no- <i>bereziniae</i>	165
III.2.2.4.3.4.1.1. Análisis comparativo de pAbe229-114	167
III.2.2.4.3.4.1.2. Análisis comparativo de pAbe229-15 y pAbe229-9	169
III.2.2.4.3.4.1.3. Análisis comparativos de pAbe229-4 y pAbe229-1	171
III.2.2.4.3.4.1.4. Identificación de sitios XerC/D en los plásmidos de HPC229	171
III.2.2.4.3.4.2. Evaluación comparativa de los plásmidos de HPC229 contra la base de datos de <i>A. bereziniae</i>	176
III.2.2.4.3.4.2.1. Afiliación de cepas de <i>Acinetobacter</i> spp. como <i>A. bereziniae</i>	177
III.2.2.4.3.4.2.2. Análisis comparativos contra la base de datos de <i>A. bereziniae</i> : criterios empleado	178
III. 2.2.4.3.4.2.2.1. Análisis comparativos de pAbe229-114	183
III.2.2.4.3.4.2.2.2. Análisis comparativo de pAbe229-15 y pAbe229-9	184
III.2.2.4.3.4.2.2.3. Análisis comparativo de pAbe229-4 y pAbe229-1	187
III.2.2.4.3.5. Clasificación de los plásmidos de HPC229 basada en la comparación de secuencias de sus replicasas y relaxasas	187
III.2.2.4.3.5.1. Clasificación según sus replicasas	188
III.2.2.4.3.5.2. Clasificación según sus relaxasas	190
III.2.2.4.3.5.3. Clasificación de replicasas y relaxasas en la especie <i>A. bereziniae</i>	193
III.2.2.4.3.6. Identificación de sitios XerC/D en genomas de <i>A. bereziniae</i>	196
IV. Conclusiones	199
V. Referencias bibliográficas	207
Anexos	225

Abreviaturas

ADN Ácido Desoxirribonucleico

BCIP 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

BGN Bacilos Gram-negativo

BNF Bacilos Gram-negativos no fermentadores

CIM Concentración Inhibitoria Mínima

DO₆₀₀ Densidad óptica (600 nm)

DR Repetición directa (del inglés “Direct Repeat”)

IR Repetición invertida (del inglés “Inverted Repeat”)

IRi Repetición invertida inicial

IRt Repetición invertida terminal

IRl Repetición invertida izquierda (del inglés “left”)

IRr Repetición invertida derecha (del inglés “right”)

EDTA Ácido Etilendiamino Tetracético

EGM Elemento genético móvil

EG Elemento genético

Fig. Figura

GI Islas genómica (del inglés “Genomic Island”)

h Hora (s)

IS Secuencia de inserción (del inglés “Insertion Sequence”)

kpb Kilo pares de bases

LB Medio de Luria-Bertani

mA Miliamperes

MALDI-TOF MS desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (del inglés “matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry”)

M β L Metallo- β -lactamasa

MH Agar Mueller-Hinton

MOB Movilidad (del inglés “Mobility”)

min Minuto (s)

MLSA Multilocus sequence analysis

MR Multirresistencia

NBT Azul de Nitrotetrazolio

NCBI del inglés “National Center for Biothecnology information”

oriV origen de replicación

oriT origen de transferencia

OD-PCR PCR con oligonucleótidos degenerados

pb pares de bases

PCR Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: “polymerase chain reaction”)

PFGE Electroforesis en geles de agarosa con campo pulsado (del inglés: “pulse field gel electrophoresis”)

rpm revoluciones por minuto

s Segundo(s)

SDS Dodecil Sulfato de Sodio

SβL Serino-β-lactamasa

THG Transferencia horizontal de genes

Tris N-Tris-(hidroximetil)-aminoetano

Tn Transposón

TF Transformante

TG Transconjugante

Resumen

La emergencia de cepas resistentes a los β -lactámicos en bacilos Gram-negativos (BGN) incluyendo enterobacterias y bacilos no fermentadores (BNF) como *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. causa un impacto significativo en infecciones hospitalarias provocadas por clones multirresistentes (MR). El principal mecanismo de resistencia en BGN es la inactivación de β -lactámicos mediante la acción de enzimas denominadas β -lactamasas (Bush, 2018). Entre las distintas clases de β -lactamasas, las carbapenemasas revisten la máxima importancia clínica, dado que hidrolizan carbapenemes, β -lactámicos de última generación, que suelen ser la última opción terapéutica para pacientes con infecciones por BGN MR (Queenan y Bush, 2007). Esta familia de enzimas está constituida por serino- β -lactamasas (S β LS) así como por metalo- β -lactamasas (M β LS) (Queenan y Bush, 2007). Estas últimas revisten una enorme relevancia clínica debido a su extendido espectro de acción, ya que son capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos (a excepción del aztreonam), a su asociación con otros genes de resistencia y a que aún no cuentan con inhibidores de uso clínico (Nordmann et al., 2012; Zhao y Hu, 2015). Al presente, al menos 11 familias de M β LS adquiridas han sido descritas siendo las de tipo-IMP, -VIM y -NDM mayormente detectadas a nivel mundial en cepas clínicas de BGN (Zhao y Hu, 2015; Mojica et al., 2016; Wu et al., 2019). Estas enzimas constituyen un mecanismo de resistencia con elevada implicancia epidemiológica debido a la asociación de sus genes codificantes a diversos elementos genéticos incluyendo plásmidos, integrones, secuencias de inserción y transposones, generando un desalentador escenario clínico, al cual se han referido como de “catástrofe clínica” (Cornaglia et al., 2011). En este contexto, en este Trabajo de Tesis se han caracterizado plataformas de diseminación de genes de resistencia emergentes, como *blavim-2* y *blandm-1*, evaluando asimismo los eventos involucrados en el ensamble y transferencia de dichas plataformas. Para ello, se han seleccionado como modelos de estudio especies ambientales del grupo de BNF productoras de M β LS de impacto clínico, como *Pseudomonas* grupo *putida* productoras de VIM-2 y *Acinetobacter bereziniae*, de NDM-1, bajo la hipótesis de que estas especies actuarían como nexo entre nichos ambiental y clínico, constituyendo así reservorios de genes de resistencia.

Trabajos previos del laboratorio abordaron la caracterización preliminar de las plataformas genéticas de movilización de *blavim-2* en 12 aislamientos clínicos de *P. putida*, identificados por VITEK-2, los cuales son portadores de los integrones/transposones tipo-Tn402. En este trabajo se profundizó la caracterización y localización de dichas plataformas así como aquellas presentes en aislamientos no estudiados previamente, *P. putida* HB157 y *P. aeruginosa*

HV868 por constituir este aislamiento clínico la primer cepa local de la especie productora de VIM-2. Para ello, inicialmente se abordó la caracterización taxonómica de los 13 aislamientos de *P. putida* basada en MLSA, empleando secuencias parciales de ARNr 16S, *gyrB* y *rpoD*, según esquemas propuestos para grupos o complejos de *Pseudomonas* spp. Este análisis identificó 7 especies de *P. grupo putida*, incluyendo las especies *P. putida* (aislamientos # BA9115 y BA7908) y *P. monteilii* (#HB157 y BA9713); especies nuevas propuestas por Mulet y cols., como *P. grupo putida/II* (#LA1008 y HE1012); *P. grupo putida/IV* (#LD209, HP613, HB313 y BA7816); *P. grupo putida/I* (#HP813); *P. grupo putida/V* (#BA9605); así como una nueva especie asignada aquí como *P. grupo putida/VII* (#LA111). Así, la caracterización molecular permitió distinguir una variabilidad de especies filogenéticamente relacionadas. Análisis de identidad clonal de aislamientos clínicos de la misma especie mediante OD-PCR, pusieron de manifiesto a su vez una totalidad de 11 clones diferentes, lo cual permitió identificar la diversidad genética de la colección de aislamientos bajo estudio.

La caracterización molecular de las plataformas portadoras de *bla*_{VIM-2} reveló la presencia de integrones/transposones tipo-Tn402 en todos los aislamientos en estudio. Entre ellos, se detectaron dos elementos estrechamente relacionados entre sí, ambos con la maquinaria de transposición completa, que incluye módulo de transposición (*tni*) e IRs flanqueantes, los cuales fueron designados Tn6335 y Tn6336. El primero de ellos fue hallado en 7 especies diferentes de *P. grupo putida* incluyendo *P. putida* (#BA7908), *P. monteilii* (#BA9713), *P. grupo putida/I* (#HP813), *P. grupo putida/II* (#LA1008 y HE1012), *P. grupo putida/IV* (#LD209, HP613 y HB313), *P. grupo putida/V* (#BA9605) y *P. grupo putida/VII* (#LA111); así como en *P. aeruginosa* (#HV868); mientras que Tn6336 fue hallado en las especies *P. putida* (#BA9115) y *P. grupo putida/IV* (#BA7816). La estructura genética del Tn6335 incluye al integrón In41, el cual posee en su región variable *bla*_{VIM-2}-*aacA4*, mientras que Tn6336 incluye al In899, cuya región variable contiene solo *bla*_{VIM-2}. La tercer estructura caracterizada fue la plataforma de *P. monteilii* HB157, la cual mostró un transposón tipo-Tn402 incompleto portador del In528 siendo su estructura IRi-*intI1*-*dhfrB*-*aacA4*-*bla*_{VIM-2}-*tniC*-IS6100. El conjunto de resultados reveló la prevalencia de integrones/transposones tipo-Tn402 relacionados entre sí en diferentes especies de *P. grupo putida* así como en la cepa de *P. aeruginosa* incluida en el estudio, lo cual sugiere la transferencia de estos elementos genéticos entre diferentes especies de *Pseudomonas*. Estos resultados motivaron así el análisis de los mecanismos involucrados en la diseminación de dichos transposones.

El análisis taxonómico efectuado en este trabajo de las cepas bajo estudio permitió reconocer que la movilización de *bla_{VIM-2}* mediante ensayos de transferencia de ADN previamente realizados en el laboratorio, se halla esencialmente ligada a plásmidos conjugativos de amplio rango de hospedador, que son transferidos entre las diferentes especies de *P. grupo putida*. Ensayos de transferencia de ADN realizados en este trabajo para aislamientos previamente no caracterizados, *P. monteilii* HB157 y *P. aeruginosa* HV868, mostraron que en esta última especie, *bla_{VIM-2}* se encuentra localizado en un plásmido replicativo en *P. aeruginosa* aunque no en *E. coli*. Ensayos posteriores de restricción de los extractos plasmídicos, y secuenciación nucleotídica en casos seleccionados, revelaron que los plásmidos derivados de *P. grupo putida*/II HE1012 (pHE1012); *P. grupo putida*/IV HB313 (pHB313) y BA7816 (pBA7816); y *P. grupo putida*/V BA9605 (pBA9605) tienen una arquitectura similar respecto a plásmidos controles empleados derivados de *P. grupo putida*/IV, y de *P. grupo putida*/VII (pLD209 y pLA111, respectivamente), secuenciados previamente. Estos resultados pusieron de manifiesto la identidad de los mismos, denominados por ello plásmidos tipo-pLD209; resultados que indican la circulación de los mismos por diferentes cepas así como entre diferentes especies de *P. grupo putida*. Análisis de localización de las plataformas portadoras de *bla_{VIM-2}* según ensayos de digestión del ADN genómico con S1 o *Xba*I/PFGE y ensayos de hibridación permitieron determinar la portación cromosomal de *bla_{VIM-2}* para *P. putida* BA9115 y BA7908, *P. monteilii* HB157 y BA9713, *P. grupo putida*/I HP813, *P. grupo putida*/II LA1008 y *P. grupo putida*/IV HP613, como así también confirmar la portación de *bla_{VIM-2}* en plásmidos tipo-pLD209 en los restantes aislamientos de *P. grupo putida*. Para el caso de *P. aeruginosa* HV868, la banda de elevado tamaño molecular según S1/PFGE correspondería al plásmido conjugativo resultante de ensayos de transferencia de ADN. Por último, la evaluación de los sitios de inserción del Tn6335 en cromosoma de *P. grupo putida*/IV HP613 y *P. grupo putida*/II LA1008 revelaron que el mismo se encuentra interrumpiendo el sitio *res* de transposones tipo-Tn501 y tipo-Tn1403, respectivamente; agregando así evidencias de que sitios *res* de transposones tipo-Tn3 son blancos de elección para la inserción de transposones tipo-Tn402, *e.g.* Tn6335. Aun así, resultados de ensayos de clonado y secuenciación mostraron la inserción del Tn6335 en cromosoma, en diferentes regiones del sitio *res* respecto a reportes de otros transposones tipo-Tn402, mostrando nuevos sitios blancos específicos de inserción.

Los resultados en conjunto revelaron que plásmidos tipo-pLD209 constituyen el principal elemento de transferencia intra-específica de *bla_{VIM-2}* según su hallazgo entre clones pertenecientes a la misma especie, *e.g.* #LD209, y BA7816, correspondientes a *P. grupo*

putida/IV; como de transferencia inter-específica observado según el hallazgo en *P. grupo putida*/IV, *P. grupo putida*/II (HE1012), *P. grupo putida*/V (BA9605), y *P. grupo putida*/VII (LA111). Evidencias de eventos de transposición intra-específicos han sido observadas, derivadas del hallazgo del Tn6335 en cromosoma y en plásmido de aislamientos clonales de la misma especie, *e.g.* Tn6335 en las cepas clonales *P. grupo putida*/IV HP613 y LD209; respectivamente. Evidencias similares de portación de Tn6335 en cromosoma y en plásmido han sido observadas para cepas diferentes de la misma especie, *e.g.* *P. grupo putida*/II LA1008, *P. grupo putida*/II HE1012, respectivamente. El conjunto de resultados de este trabajo señalan la capacidad de diferentes especies de *P. grupo putida* para intercambiar plásmidos conjugativos (tipo-pLD209), y/o movilizar intra-genómicamente transposones completos portadores de *bla*_{VIM-2}, constituyendo estas estructuras integrones/transposones, al presente escasamente reportadas, y quizás subestimadas como elementos genéticos de transferencia de genes en el género *Pseudomonas*. El hallazgo de un plásmido conjugativo en *P. aeruginosa* (diferente a los tipo-pLD209), portador del Tn6335 aporta evidencias de que especies de *P. grupo putida*, serían reservorios ambientales de genes de resistencia, y responsables de la transferencia de plataformas de resistencia a patógenos nosocomiales (como *P. aeruginosa*). Estos resultados muestran que diferentes miembros de *P. grupo putida* pueden constituirse en un nexo entre bacterias ambientales y clínicas.

La emergencia de cepas productoras de NDM, asociada a infecciones de elevadas tasas de morbi-mortalidad es actualmente una grave problemática de Salud Pública (Wu et al., 2019). En este contexto, la diseminación de *bla*_{NDM-1} en enterobacterias así como en *Acinetobacter baumannii* ha sido reportada profusamente (Dortet et al., 2016). Sin embargo, el rol de especies ambientales, *e.g.* *A. bereziniae*, como reservorios de genes de resistencia de impacto clínico no ha sido dilucidada y es materia de estudio en este trabajo. Se evaluó así la capacidad de una especie de *Acinetobacter*, infrecuentemente asociada a la clínica, para el ensamble de plataformas genéticas capaces de movilizar genes de resistencia a antimicrobianos (*e.g.* *bla*_{NDM-1}) entre bacterias ambientales y patógenos nosocomiales. Asimismo, ha sido un objetivo específico la caracterización del contenido plasmídico de la cepa de *A. bereziniae* tomada como modelo de estudio, bajo la idea de dilucidar los elementos genéticos que facilitan la supervivencia de estas bacterias en diferentes nichos (ambiental/clínico). El aislamiento clínico HPC229, preliminarmente identificado como *Acinetobacter lwoffii*, fue caracterizado en base a los marcadores ARNr 16S, *gyrB* y *rpoB*, por lo cual fue reasignado a la especie *A. bereziniae*. La caracterización molecular de la plataforma portadora de *bla*_{NDM-1} en HPC229 mediante técnicas de biología molecular así como secuenciación mostró que *bla*_{NDM-1} se encuentra asociado al

transposón compuesto Tn $I25$, el cual a su vez se halla inserto en un plásmido no conjugativo, de 44 kpb, denominado pNDM229. Pudo reportarse así el primer aislamiento de *A. bereziniae* productor de NDM-1 en América y el segundo de esta especie reportada en el mundo (Brovedan et al., 2015). La comparación nucleotídica de pNDM229 contra plásmidos relacionados hallados en *A. lwoffii* y *A. bereziniae* (pNDM-BJ01 y pNDM-40-1, respectivamente) mediante herramientas bioinformáticas mostró que pNDM229 presenta semejante esqueleto plasmídico que dichos plásmidos, perteneciendo así al grupo de plásmidos denominados tipo-pNDM-BJ01 (Jones et al., 2015). Sin embargo, pNDM229 muestra características únicas, como el hallazgo de una segunda copia de tipo-IS $AbaI4$ corriente abajo del Tn $I25$, por lo cual conformaría un transposón compuesto flanqueado por dos copias de IS $AbaI4$, lo cual podría proveer capacidad de movilizar no sólo a bla_{NDM-1} , sino también a *aphA6*, codificante de una aminoglucósido-acetiltransferasa; y delecciones en genes esenciales del Sistema de Secreción tipo IV (SST4) (*e.g. virB8-virB11* y *virD4*) lo que explicaría la falla en la recuperación de transconjugantes.

Bajo el objetivo de evaluar la diseminación de bla_{NDM-1} mediante plásmidos tipo-pNDM-BJ01 en el género *Acinetobacter* se realizaron estudios comparativos de la secuencia nucleotídica de pNDM229 contra bases de datos de *Acinetobacter* spp. Los resultados revelaron la existencia de 21 plásmidos tipo-pNDM-BJ01, y otros 5 plásmidos con esqueletos diferentes; reportados en numerosas especies de *Acinetobacter*. Entre estos últimos, la región de homología correspondiente a la región de adaptabilidad resultó ser el Tn $I25$ o parte del mismo. El alineamiento de esta región para el conjunto de los plásmidos tipo-pNDM-BJ01 incluyendo pNDM229, reveló plataformas diferentes, que evidencian rearrreglos genéticos. Estas variaciones incluyen esencialmente delecciones del Tn $I25$, o bien adquisiciones de ISs, que conforman transposones compuestos potencialmente movilizables (*e.g.* “Tn $I4$ ” de pNDM229). Sin embargo, se presentan regiones conservadas en ambos extremos de la misma e involucra en el extremo 5’ la estructura IS $AbaI4$ -*aphA6*-IS $AbaI25$ - bla_{NDM-1} -*ble*; y en el extremo 3’, el gen codificante de la resolvasa TnpR así como una región intergénica de 160 nt corriente arriba del mismo. Por último, la búsqueda sistemática de estructuras ancestrales putativas en *Acinetobacter* spp. mostró regiones homólogas a ambas conservadas descritas, en cepas de *A. parvus* y de *A. pittii*. Así, se propone un modelo hipotético que sugiere que la transposición del Tn $I25$ sería una de las últimas etapas, la cual dio origen al plásmido pNDM-BJ01 detectado en *A. lwoffii*, a partir del cual derivan restantes plásmidos tipo-pNDM-BJ01 (como pNDM229). Este modelo aporta evidencias de que especies ambientales de *Acinetobacter* serían responsables del ensamble de estructuras potencialmente móviles (como plásmidos tipo-pNDM-BJ01), y por tanto agrega evidencias de que especies ambientales del género constituyen reservorios de genes de resistencia.

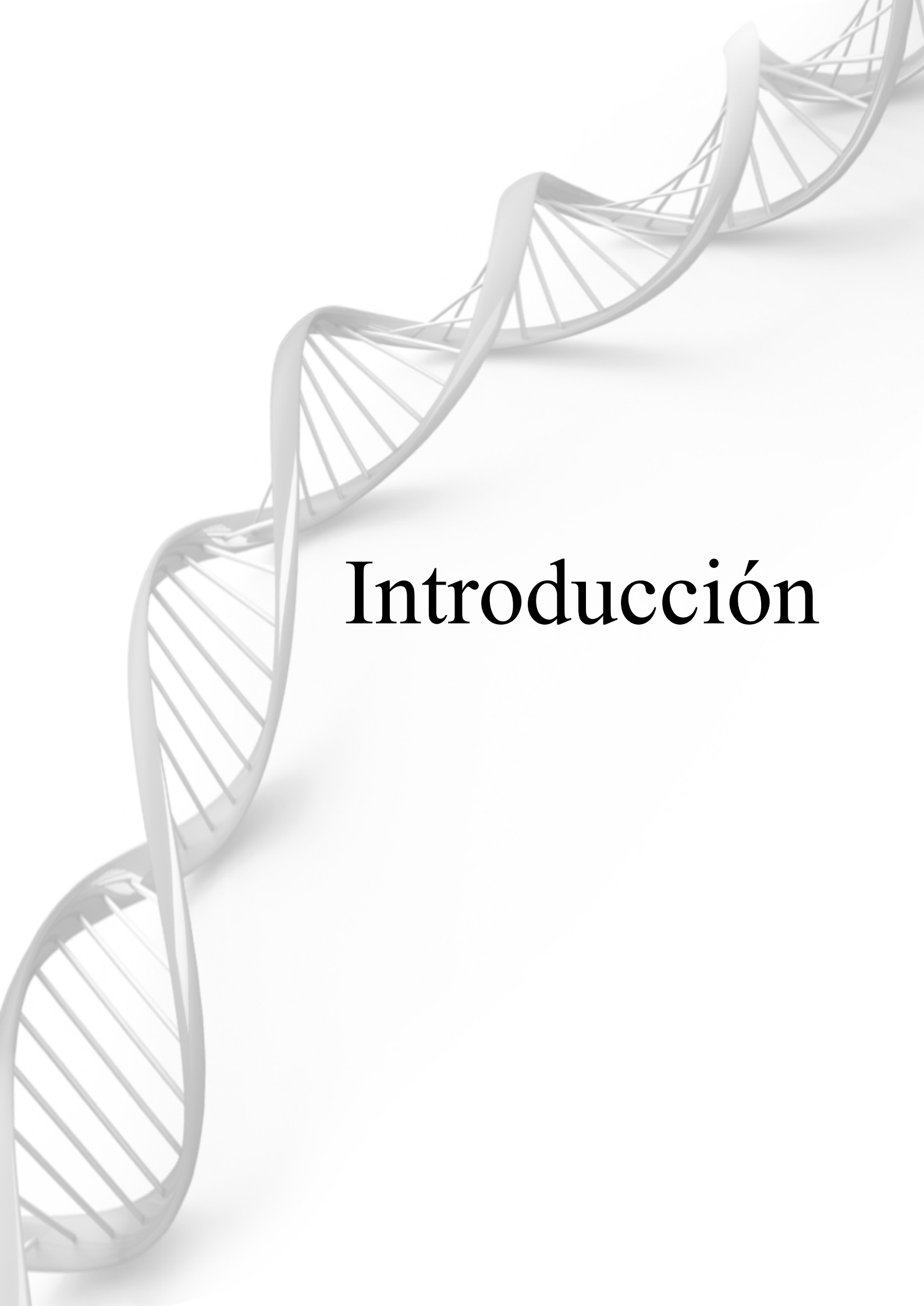
La secuenciación y caracterización de plásmidos co-residentes con pNDM229 en la cepa clínica *A. bereziniae* HPC229 permitió distinguir regiones de replicación, estabilidad, transferencia y adaptabilidad en los plásmidos denominados pAbe229-114, pAbe229-15, pAbe229-9, pAbe229-4 y pAbe229-1 (por sus tamaños moleculares). Las comparaciones contra bases de datos mostraron que son plásmidos no reportados previamente. No obstante, regiones parciales fueron detectadas en diversos plásmidos de *Acinetobacter* spp., evidenciando así regiones expuestas a THG entre diferentes especies de *Acinetobacter*. El análisis de pAbe229-114 (114 kpb) reveló un esqueleto plasmídico similar al hallado en pAV3, derivado de una cepa ambiental de *A. venetianus*, dada la homología de las regiones de replicación y estabilidad. Sin embargo, pAbe229-114 presenta regiones únicas que incluyen un SST4 incompleto de elevado contenido GC (57%), lo cual sugiere su adquisición desde otro género bacteriano (*e.g.* *P. stutzeri*); y numerosos genes involucrados en la resistencia a metales pesados, a estrés oxidativo como así también a bacteriófagos. La detección de numerosos elementos genéticos incluyendo islas genómicas, ISs y transposones revelan una larga historia de rearrreglos genéticos. La estructura general de los plásmidos pAbe229-15 (15 kpb) y pAbe229-9 (9 kpb) resultó ser semejante, constituyendo plásmidos movilizables dado que poseen una región de transferencia *mobA-oriT*. Aun cuando la región de adaptabilidad es característica para cada uno de ellos, ambos tienen en común numerosos sitios de recombinación XerC/D, bordeando módulos de replicación, transferencia y adaptabilidad, lo cual sugiere la movilización de dichas regiones por eventos de recombinación mediados por sitios XerC/XerD. El análisis de pAbe229-4 (4 kpb) mostró que, a pesar de no contener genes codificantes de replicasa y relaxasa, posee un sistema TA que le otorga estabilidad. Por su parte, el análisis de pAbe229-1 (1 kpb) reveló un plásmido de reducido tamaño sin características funcionales conocidas, y constituye el elemento de menor tamaño reportado al presente en *Acinetobacter* spp.

La clasificación de los plásmidos de HPC229 se basó en la comparación de las secuencias aminoacídicas de las replicasas, así como también en los últimos 300 AA del extremo N-terminal de sus relaxasas. Las replicasas de pAbe229-114, pAbe229-15 y pAbe229-9 están incluidas dentro de los “*Acinetobacter* Rep-3 Groups” (AR3G) descriptos, *i.e.* AR3G4, AR3G3 y AR3G6, respectivamente. Por otro lado, las relaxasas de pAbe229-15 y pAbe229-9 así como de pNDM229 se clasificaron en el subgrupo MOB_{Q1}, mientras que la relaxasa de pAbe229-114 forma parte de un grupo filogenético diferente, MOB_{P111}. Aun cuando ninguno de los plásmidos de HPC229 se muestra conjugativo según análisis *in silico*, la presencia de relaxasas en estos últimos sugiere su potencial movilización.

Plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1}, como pNDM229 de la cepa local y pNDM-40-1 de la cepa clínica *A. bereziniae* CHI-40-1 han sido reportados. Sin embargo, al presente hay escasos datos del genoma accesorio de esta especie. En este contexto, se caracterizó aquí *in silico* el contenido plasmídico de genomas depositados de cepas de *A. bereziniae*. Para ello, se efectuó la búsqueda sistemática de marcadores plasmídicos en 7 genomas disponibles, así como de dos cepas aquí asignadas a esta especie mediante la herramienta bioinformática orthoANI (*Acinetobacter* Ag2 y WC-743). Se identificaron 16 replicasas, 7 en CHI-40-1; 4 EN 507_ABAU; 3 KCTC 23199; 2 en CIP 70.12; y 1 en WC-743, Ag2 y NIPH3, que agruparon en 11 de los 15 grupos caracterizados de AR3G, descritos en *Acinetobacter* spp. Por otro lado, se detectaron 8 relaxasas, 6 en CHI-40-1, y 1 en 507_ABAU y WC-743, las cuales clasifican dentro de los grupos MOB_{Q1} y MOB_{Qaci}. Como resultado del análisis global, se destaca que las cepas clínicas portadoras de *bla*_{NDM-1}, HPC229 y CHI-40-1, contienen elevado número de replicasas y relaxasas, mostrando la diversidad de plásmidos que albergan las únicas dos cepas clínicas MR de esta especie, con genomas completos (Jones et al., 2015; Brovedan et al., 2016).

Por último, se realizaron búsquedas de sitios de recombinación XerC/D en los genomas de *A. bereziniae* bajo el objetivo de identificar módulos potencialmente intercambiables, bordeados por dichos sitios. Para ello, inicialmente se efectuó la búsqueda sistemática de dichos sitios en los plásmidos de HPC229, mostrando 5 en pAbe229-15; 4 en pAbe229-9; 2 en pAbe229-114; 1 en pAbe229-4; y ninguno en pNDM229. Diez de estos sitios tienen una región central (cr) de 6 nucleótidos de longitud lo que llevó a generar un consenso para los sitios XerC/D en *A. bereziniae* HPC229. Empleando este consenso, se identificaron luego 55 putativos sitios en los genomas de las cepas de la especie; 31 en CHI-40-1, 7 en 507_ABAU, 5 en Ag2, 4 en WC-743, 3 en KCTC 23199, y 2 en las cepas CIP 70.12 y NIPH3 y 1 en XH901. Los resultados mostraron que las cepas clínicas portadoras de *bla*_{NDM-1}, CHI-40-1 y HPC229, son las que contienen mayor número de sitios. Estos resultados sumados a lo expuesto anteriormente sugieren una correlación entre cepas adaptadas al entorno hospitalario con la presencia de diversidad de plásmidos, así como numerosos sitios XerC/D en sus secuencias nucleotídicas que aportan plasticidad a módulos de plásmidos, y a plásmidos en sí mismos, para su intercambio y diseminación a través de recombinación sitio-específica y/o formación de cointegrados.

Los resultados globales de la caracterización de los plásmidos de la cepa clínica *A. bereziniae* HPC229 muestran que la portación de una diversidad de elementos genéticos le permiten mayor adaptabilidad y supervivencia en diferentes hábitats incluyendo nichos ambientales como clínicos, constituyendo así esta especie un nexo probable entre diferentes grupos bacterianos.



Introducción

I. Introducción general

I.1. Infecciones nosocomiales y resistencia bacteriana a los antibióticos: hito de la medicina moderna

Las infecciones causadas por microorganismos patógenos causan un impacto profundo en la salud humana debido a su elevada morbi-mortalidad. La introducción del uso de los antibióticos ha permitido reducir las tasas de muerte causadas por las infecciones nosocomiales (Van Hoek et al., 2011). El primer antibiótico descubierto fue la penicilina en 1929 por Alexander Fleming, el cual informó el hallazgo de una sustancia producida por un hongo (*Penicillium*) capaz de lisar bacterias. A partir de ese momento, el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos fue muy rápido, marcando así el comienzo de la “Era de los Antibióticos” (Joly-Guillou, 2005; Gordon y Wareham, 2010). Se pensó en la práctica clínica que las infecciones serían superadas con facilidad, lo cual llevó al empleo de los mismos en forma masiva tanto en medicina humana como veterinaria (Dijkmans et al., 2015). No obstante, poco tiempo después del profuso empleo de los antibióticos, emergieron bacterias capaces de sobrevivir al efecto antibacteriano de los mismos (Ventola, 2015). En principio, la observación de estas resistencias antimicrobianas fue una consecuencia natural asociada al uso de los antibióticos. Sin embargo, a raíz de su uso incorrecto e indiscriminado, tanto en medicina humana, veterinaria como en agricultura, este fenómeno natural se aceleró de tal forma, que la velocidad de eclosión de las resistencias superó la velocidad de descubrimiento de nuevas moléculas antimicrobianas. En este contexto, es de destacar que los antibióticos β -lactámicos constituyeron y aún constituyen, una de las principales familias de compuestos antimicrobianos utilizados en la clínica (Bush y Bradford, 2016). Este panorama condujo a que la resistencia asociada a los mismos sea actualmente uno de los problemas más importantes en salud humana.

I.2. Antibióticos β -lactámicos

Los β -lactámicos están indicados para el tratamiento de una gran variedad de infecciones causadas por microorganismos. Tradicionalmente, han sido activos sólo contra bacterias Gram-positivas, pero el desarrollo de β -lactámicos de espectro ampliado, activos contra microorganismos Gram-negativos, ha incrementado su utilidad (Hall y Barlow, 2004). Constituyen una amplia familia de antimicrobianos que tienen en común la presencia de un anillo β -lactámico en su estructura (Fig. I.1). Estos incluyen derivados de la penicilina, cefalosporinas,

monobactamas, carbapenemes e inhibidores de β -lactamasas (Medeiros, 1997; Hall y Barlow, 2004; Babic et al., 2006; Mojica et al., 2016).

Los β -lactámicos actúan inhibiendo las enzimas implicadas en la última etapa de la síntesis del peptidoglicano, impidiendo la reacción de transpeptidación, por lo que la pared celular se debilita y la bacteria se lisa (Matagne et al., 1998). Las proteínas que constituyen el blanco de los antibióticos β -lactámicos se conocen con el nombre general de proteínas de unión a penicilina (“penicillin-binding proteins”, PBPs) e incluyen, entre otras, transpeptidasas y endopeptidasas. La acción bactericida de los β -lactámicos se debe a que su esqueleto principal comprende un anillo de amida cíclico de cuatro miembros (anillo β -lactámico). El reconocimiento de un compuesto β -lactámico por una PBP culmina en la formación irreversible de un complejo covalente acil-enzima (Matagne et al., 1998).

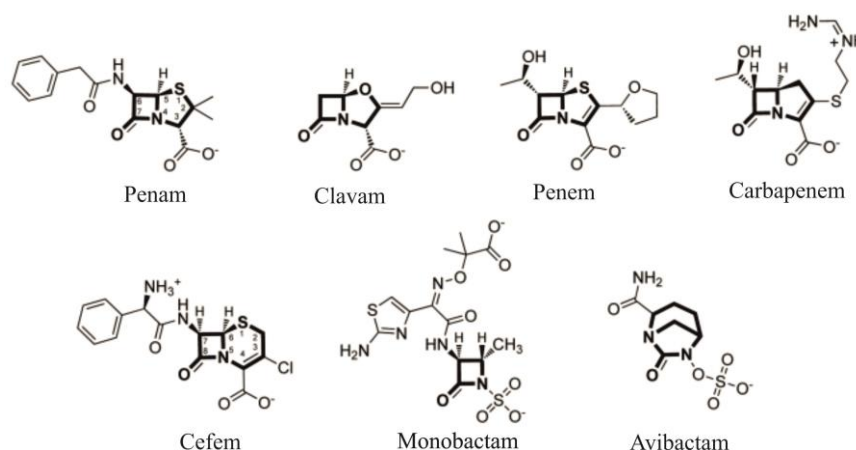


Figura I.1. Familia de compuestos β -lactámicos y un derivado γ -lactámico. Se muestran ejemplos de estructuras químicas de seis categorías estructurales de β -lactámicos incluyendo penam (bencilpenicilina), clavam (ácido clavulánico), penem (faropenem), carbapenem (imipenem), cefem (cefactor), monobactam (aztreonam) y γ -lactámico (avibactam). El anillo β -lactámico y su derivado γ -lactámico se resaltan en negrita. Figura adaptada (Mojica et al., 2016).

El primer β -lactámico introducido en la práctica clínica fue la penicilina G en 1940 (Medeiros, 1997). Este compuesto ha sido el más utilizado para el tratamiento de infecciones en el hombre causadas por diferentes microorganismos (*e.g.* *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, entre otros), y así el período comprendido entre 1940-1960 se lo denominó era de la penicilina (Medeiros, 1997). Sin embargo, en 1942 se describieron aislamientos de *S. aureus* resistentes a penicilina en pacientes bajo tratamiento con dicho antimicrobiano (Medeiros, 1997; Davies J. y Davies D., 2010). La resistencia se debió a la producción por parte de los microorganismos de enzimas, β -lactamasas, que inactivaban la penicilina, denominadas penicilinasas, situación que impulsó al desarrollo de otros β -lactámicos

(Medeiros, 1997; Davies J. y Davies D., 2010). Se inicia así una nueva era que abarca entre 1960 y 1978, donde se incorporan en la clínica las penicilinas de espectro ampliado (*e.g.* meticilina, oxacilina, ampicilina, carbenicilina, ticarcilina) y cefalosporinas de primera generación (*e.g.* cefalotina y cefazolin). Sin embargo, surgieron bacterias resistentes a dichos compuestos, principalmente bacilos Gram-negativos (BGN) productores de diversas β -lactamasas, conduciendo al desarrollo de nuevos β -lactámicos. Luego, en el período comprendido entre 1978 y 1995, se desarrollaron nuevos β -lactámicos con mayor espectro de acción y estables a la degradación enzimática; período que fue denominado era de las cefamicinas, cefalosporinas de espectro extendido, inhibidores de β -lactamasas, monobactamas y carbapenemes (Davies J. y Davies D., 2010). Se introdujeron así a la clínica las cefamicinas (*e.g.* cefoxitina); nuevas generaciones de cefalosporinas, incluyendo a las cefalosporinas de segunda generación (*e.g.* cefaclor y cefuroxima), a las de tercera generación (*e.g.* cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona), y a las de cuarta generación (*e.g.* cefepime y cefpirome); las monobactamas, siendo aztreonam el de uso clínico; inhibidores de β -lactamasas (*i.e.* ácido clavulánico, sulbactama, y tazobactama); así como carbapenemes (Davies J. y Davies D., 2010). El primer carbapenem caracterizado (tienamicina) fue descubierto como un producto natural de *Streptomyces cattleya*. Luego, se sintetizaron derivados sintéticos o semisintéticos más estables que la tienamicina, como imipenem (1985), y posteriormente, meropenem (1996), ertapenem (2001) y doripenem (2005). En particular, imipenem y meropenem fundamentalmente, se caracterizan por ser los β -lactámicos de elección para el tratamiento de infecciones intrahospitalarias producidas por BGN resistentes a múltiples antimicrobianos e incluye a enterobacterias y bacilos Gram-negativos no fermentadores (BNF) como *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Livermore, 2002; Rossolini y Mantengoli, 2005; Robledo et al., 2010; Cornaglia et al., 2011; Hamouda et al., 2011). Por último, el desarrollo reciente de avibactam (Fig. I.1) ilustra cómo el propio anillo de β -lactámico puede expandirse para producir un derivado γ -lactámico que, sin embargo, mantiene un mecanismo de acción similar a los β -lactámicos (Mojica et al., 2016).

I.3. Mecanismos de resistencia a β -lactámicos

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos β -lactámicos, tal como se expuso previamente, es consecuencia del uso indiscriminado de los mismos tanto en medicina humana, veterinaria como en agricultura. (Hall y Barlow, 2004; Davies y Davies, 2010; Dijkmans et al., 2015). Los principales mecanismos de resistencia bacteriana frente a los β -lactámicos incluyen: i) alteraciones en el blanco molecular de los β -lactámicos (PBPs) de manera que no puedan ser

reconocidos por los β -lactámicos; ii) delección o alteración de porinas en la membrana; iii) bombas que expulsan antibióticos al medio externo; iv) producción de enzimas β -lactamasas capaces de hidrolizar los β -lactámicos (Fig. I.2) (Babic et al., 2006; Bush y Jacoby, 2010).

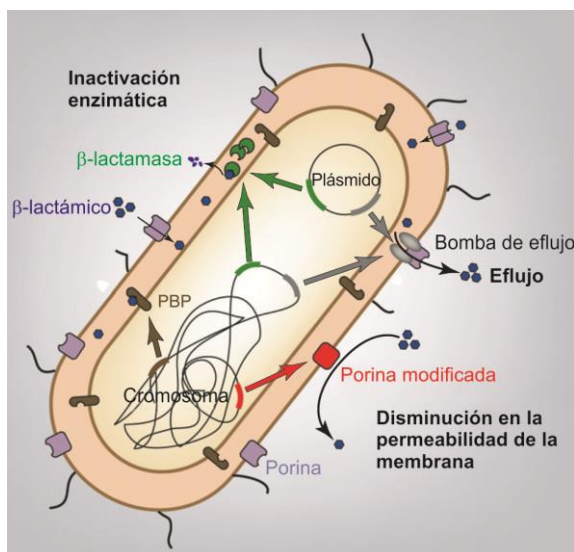


Figura I.2. Principales mecanismos de resistencia a antibióticos en BGN. Los principales mecanismos de resistencia son la inactivación enzimática, la producción de bombas de eflujo, y la modificación y/o delección de las porinas de membrana. Se indica la posible localización de los genes involucrados en la resistencia a antibióticos (en verde, gris, y rojo; respectivamente). Figura adaptada (Nordmann et al, 2012).

I.3.1. β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico de los antibióticos β -lactámicos, transformándolos en un derivado β -aminoácido inactivo antes de que el antibiótico tenga la posibilidad de interactuar con las PBPs (Matagne et al., 1998). En BGN, estas enzimas están localizadas en el espacio periplásmico, y constituyen el mecanismo de resistencia prevalente frente a estos antimicrobianos.

El desarrollo de nuevos antibióticos β -lactámicos se enfocó en la obtención de compuestos capaces de eludir la acción de las β -lactamasas (Medeiros, 1997; Jacoby y Munoz-Price, 2005; Bush y Jacoby, 2010). Sin embargo, la presión de selección ejercida por el uso de estos nuevos compuestos sobre la población de microorganismos patógenos, llevó a la selección de variantes de β -lactamasas con capacidad de hidrolizar una gran variedad de antibióticos β -lactámicos, es decir enzimas con un espectro de sustratos más extendido (Medeiros, 1997; Jacoby y Munoz-Price, 2005; Bush y Jacoby, 2010).

Las β -lactamasas se clasifican bioquímicamente en dos amplios grupos según el mecanismo por el cual realizan la hidrólisis de los β -lactámicos, ya sea a través de la formación

de un intermediario covalente acil-enzima por ataque nucleofílico del -OH del residuo serina conservado, en el sitio activo de serino- β -lactamasas ($\text{S}\beta\text{Ls}$); o mediante una reacción hidrolítica facilitada por uno o dos iones de zinc esenciales en los sitios activos, en el caso de metalo- β -lactamasas ($\text{M}\beta\text{Ls}$) (Fig. I.3; Bush, 2018). Con el advenimiento de la secuenciación, se propusieron 4 clases moleculares incluyendo A, B, C y D; esquema basado en tamaño molecular y homología de secuencia (Fig. I.3). Sin embargo, las diferencias bioquímicas entre penicilinasas y cefalosporinasas se habían reconocido mucho antes de que las secuencias estuvieran disponibles, y las β -lactamasas conocidas se distinguían según las capacidades funcionales relacionadas con los perfiles de sustrato e inhibidores (Bush, 2018). A medida que se introdujeron sustratos e inhibidores en la práctica clínica y la secuenciación de genes se volvió accesible y rutinaria, las características moleculares y funcionales se combinaron en un esquema de clasificación más completo. Hoy en día, al menos 17 grupos funcionales asociados con las cuatro clases moleculares se han distinguido (Fig. I.3; Bush y Jacoby, 2018). Las β -lactamasas habitualmente se diferencian respecto a la hidrólisis relativa según los sustratos penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, y monobactamas. Es posible una mayor diferenciación en función de las reacciones con el ácido clavulánico (inhibidor de la clase A), avibactam (inhibidor de β -lactamasas de clases A, C y D), y el quelante EDTA de iones metálicos (inhibidor de β -lactamasas de clase B o $\text{M}\beta\text{Ls}$) (Fig. I.3; Bush, 2018).

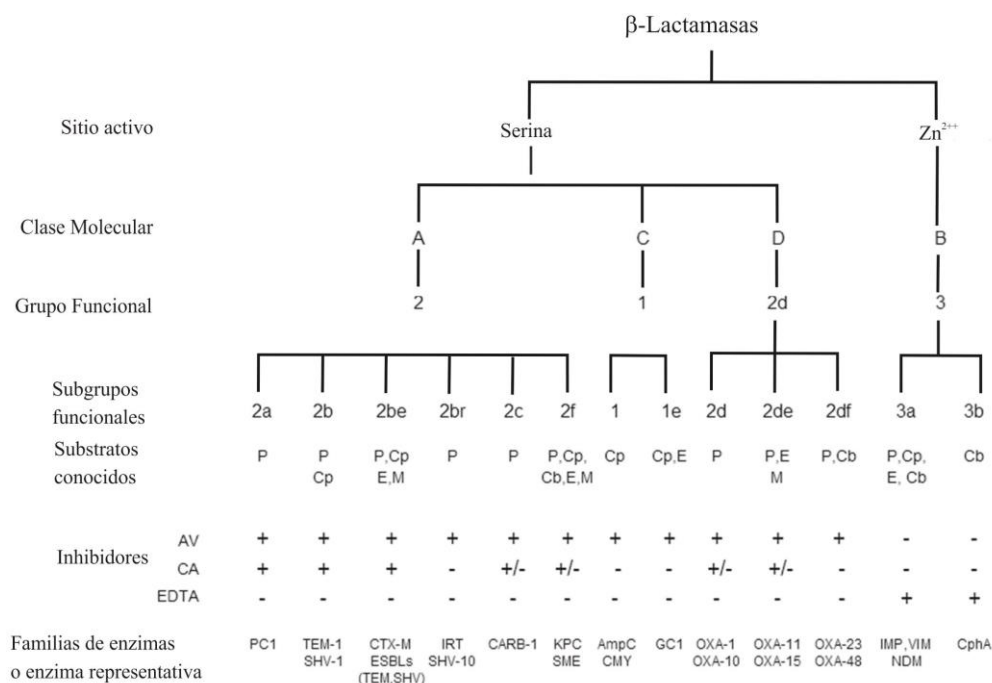


Figura I.3. Relaciones moleculares y funcionales entre las β -lactamasas. AV, avibactam; CA, ácido clavulánico; Cb, carbapenem; Cp, cefalosporina; E, cefalosporina de espectro extendido; M, monobactama; P, penicilina. Figura adaptada (Bush, 2018).

En 2018 se describieron 2.771 β -lactamasas, con un predominio de enzimas grupo 2 y 1 (clases A y C, respectivamente, Fig. I.4), dado en gran parte por el incremento de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) como por ejemplo las enzimas del grupo 2be (Figs. I.3 y I.4), desde 1990 (Walsh et al., 2005; Queenan y Bush, 2007; Bush y Jacoby, 2010; Bush, 2018). Entre las β -lactamasas consideradas de mayor impacto clínico se incluyen a las BLEE (e.g. subgrupo 2be, Fig. I.3), capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos a excepción de los carbapenemes; a las β -lactamasas de los subgrupos 2f y 2df (serino-carbapenemasas o SCB) por su mayor espectro de acción que incluye a los carbapenemes (Bush y Jacoby, 2010; Bush, 2018); y al subgrupo 3a (MBLs subclase B1) dado que además de un amplio espectro de acción debido a que hidrolizan todos los β -lactámicos (a excepción de aztreonam) no son inhibidas por inhibidores de uso clínico (Fig. I.3). Todo este grupo de β -lactamasas es codificado en elementos genéticos móviles (EGM), por lo que su diseminación se ve enormemente facilitada (Babic et al., 2006).

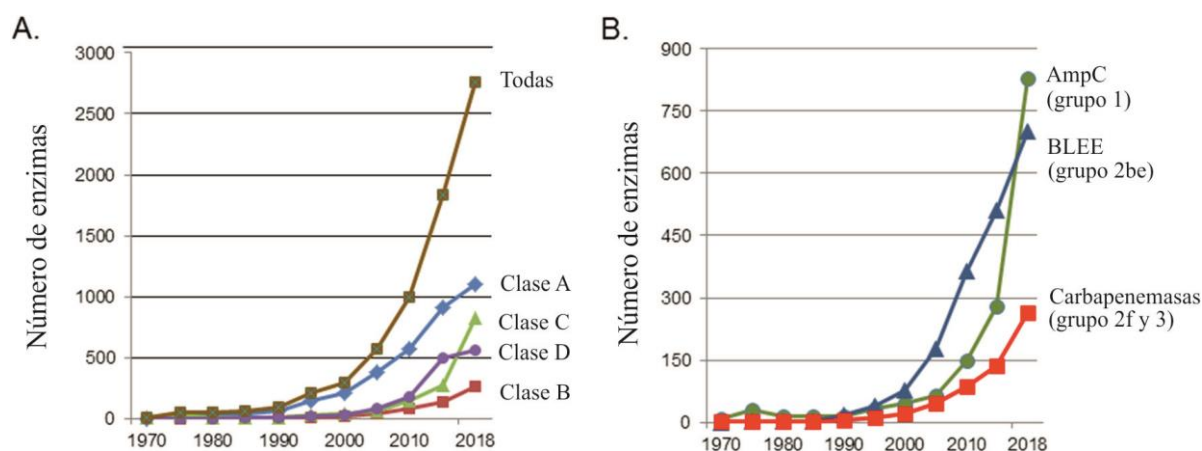


Figura I.4. Incremento del número de β -lactamasas entre 1970 y 2018. A. β -lactamasas enumeradas según clases moleculares A, B, C y D, con el número total de enzimas (2.771). B. β -lactamasas enumeradas de acuerdo con los principales grupos funcionales, AmpC, grupo 1; BLEE, grupo 2be; y carbapenemasas, grupos 2f y 3. Figura adaptada (Bush, 2018).

I.3.1.1. Mecanismo de resistencia enzimático a carbapenemes en BGN: carbapenemasas

La emergencia de la resistencia a β -lactámicos debido a la producción de enzimas que hidrolizan carbapenemes (o carbapenemasas) en BGN, incluyendo enterobacterias y bacilos no fermentadores (BNF) como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, es uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad (Cornaglia et al., 2007; Queenan y Bush, 2007; Cornaglia et al., 2011). Los carbapenemes (e.g. imipenem y meropenem) son potentes β -lactámicos de última generación implementados con éxito desde la década del 80 y se destacan por ser resistentes a la hidrólisis por BLEE producidas por BGN (Fig. I.3, Medeiros, 1997;

Cornaglia et al., 2011). Aun así, los BGN han desarrollado distintas estrategias para evadir la acción de los carbapenemes, por lo cual la resistencia termina siendo en muchos casos multifactorial (Livermore, 2002; Vila et al., 2007; Lister et al., 2009; Cornaglia et al., 2011). Estos mecanismos incluyen la adquisición de carbapenemasas; la disminución de la entrada de la droga por déficit o disminución de la expresión de porinas de la membrana externa (*e.g.* OprD en *P. aeruginosa*, específica de imipenem); la expulsión del antimicrobiano por la presencia de sistema de bombas de eflujo (*e.g.* MexEF-OprN y MexEF-OprM, en *P. aeruginosa*, que extruyen imipenem y meropenem, respectivamente); las mutaciones en el blanco molecular de los β -lactámicos (PBPs) alterando la síntesis de la pared celular bacteriana; así como la hiperproducción de otra clase de β -lactamasas (*e.g.* β -lactamasas cromosomales tipo-AmpC). Los 2 últimos mecanismos no suelen conferir resistencia clínica a los carbapenemes, pero colaboran con la resistencia a los mismos actuando en combinación con otro/s mecanismo/s (Livermore, 2001).

Las carbapenemasas abarcan un repertorio heterogéneo de enzimas capaces de hidrolizar a la mayoría de los β -lactámicos empleados en la clínica (Bush y Jacoby, 2010) y pertenecen a las S β LS de clases moleculares A y D, o M β LS de clase molecular B (grupos funcionales 2f y 2df, o 3; respectivamente, Fig. I.3). Hasta antes de los años 90, los BGN productores de carbapenemasas se asociaban a casos esporádicos o a reducidos brotes nosocomiales. Sin embargo, la presencia de BGN patógenos productores de carbapenemasas adquiridas, denominadas así por su asociación a EGM, se ha reportado desde principios de la década del 90. A partir de mediados de la década del 2000 se observó un incremento progresivo mundial de cepas productoras de estas enzimas (Walsh et al., 2005; Rasmussen y Hoby, 2006; Rasmussen y Høiby, 2007; Cornaglia et al., 2007; Queenan y Bush, 2007; Bush y Jacoby, 2010; Cornaglia et al., 2011; Zhao y Hu, 2015; Bush, 2018). La producción de carbapenemasas adquiridas es así un fenómeno de enorme relevancia clínica mundial por las limitaciones terapéuticas en infecciones hospitalarias provocadas por clones resistentes a múltiples drogas (MDR, Pagani et al., 2005; Cornaglia et al., 2007), extensamente resistentes (XDR, Magiorakos et al., 2012) o pan-resistentes (PDR, Magiorakos et al., 2012).

Las S β LS cuentan con nuevos inhibidores de uso clínico tales como avibactam y vaborbactam (Stachyra et al., 2009; Lomovskaya et al., 2017), sumados a los usualmente empleados como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Drawz y Bonomo, 2010). Sin embargo, no se cuentan con inhibidores de uso clínico para las M β LS (Walsh et al., 2005) y por

lo tanto, es posible que estas enzimas, en lugar de las SβLs, puedan convertirse en las carbapenemasas predominantes en bacterias multirresistentes (MR) (Bush, 2018). No obstante, una combinación de avibactam con aztreonam (este último estable frente a MβLs) se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase 3 para tratar infecciones bacterianas por BGN, incluyendo aquellos microorganismos productores de MβLs (Bush, 2018). Así, al presente, el tratamiento antimicrobiano de pacientes infectados con BGN productores de MβLs, queda restringido a otros grupos de antibióticos, incluyendo fluorquinolonas, tetraciclinas (*e.g.* tigeciclina), aminoglucósidos, aztreonam y colistín (Helfand y Bonomo, 2005; Cornaglia et al., 2011). Sin embargo, la elección de estos últimos compuestos va a depender no solo del perfil de susceptibilidad antimicrobiana, sino a la resistencia natural de determinados BGN frente a los mismos. El colistín y la tigeciclina son los antibióticos recomendados para el tratamiento de infecciones causadas por algunos BGN multirresistentes productores de MβL (Charan et al., 2012). Sin embargo, se han descripto infecciones clínicas causadas por enterobacterias multirresistentes productoras de NDM-1, incluyendo colistín (Bonomo, 2011; Arpin et al., 2012), tigeciclina (Stone et al., 2011) o ambos, resultando así bacterias resistentes a la totalidad de los antimicrobianos disponibles para el tratamiento, o pan-resistentes (Charan et al., 2012). Estos últimos casos parecerían indicar un retorno a la era pre-antibiótica (Charan et al., 2012; Magiorakos et al., 2012). Sin embargo, es posible que nuevos antimicrobianos como el β-lactámico cefiderocol (S-649266), u otros agentes no β-lactámicos como la plazomicina, la omadaciclina o la esvaciclina, sirvan como alternativas terapéuticas confiables y seguras contra la mayoría de los patógenos resistentes a carbapenemes (Bush, 2018).

I.3.1.1.1. Carbapenemasas de clase A y D: SβLs

Se han reportado al menos nueve clases de carbapenemasas clase A (grupo 2f, Fig. I.3) incluyendo “imipenem-hydrolyzing β-lactamase” (IMI), “non-metallo-carbapenemase of class A” (NMC-A), “*Serratia marcescens* enzyme” (SME), “Guiana extended-spectrum β-lactamase” (GES), “*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase” (KPC), “*Serratia fonticola* carbapenemase” (SFC), “Brazilian *Klebsiella* carbapenemase” (BKC), “Bicêtre carbapenemase” (BIC), y “French imipenemase” (FRI) (Escandón-Vargas et al., 2016). Estas carbapenemasas se recuperan con más frecuencia en enterobacterias y son inhibidas en su mayoría por inhibidores de uso clínico (*i.e.* ácido clavulánico, sulbactama y tazobactama). Particularmente en Argentina, se han descripto enterobacterias productoras de NMC-A, SME-1, enzimas tipo-GES (*e.g.* GES-3, GES-5) y tipo-KPC (*e.g.* KPC-2) (Pasteran et al., 2011; Gomez et al., 2011; De Belder et al., 2018).

La carbapenemasa tipo-IMI posee 11 variantes según (<http://www.lahey.org/studies>) aunque solo fueron caracterizadas las primeras tres (IMI-1, -2, -3). IMI-1 se describió por primera vez en un aislamiento de *Enterobacter cloacae* en 1984, IMI-2 en la misma especie bacteriana en 2001 en China, e IMI-3 en *E. cloacae* en 2009 (Zhang et al., 2017a). La enzima NMC-A, producida por *E. cloacae*, se describió en 1990 en Francia y posteriormente en *E. cloacae* en Argentina y Estados Unidos. Los genes codificantes de NMC-A e IMI-1 se identificaron en cromosoma, mientras que IMI-2 en plásmido. Ambas clases de enzimas son infrecuentes y se asocian a casos esporádicos (Queenan y Bush, 2007; Rasmussen y Høiby, 2007). Por otro lado, la enzima SME-1 fue identificada por primera vez en *S. marcescens* en Londres en 1983, previo a la comercialización de los carbapenemes. Las variantes SME-2 y -3 identificadas por primera vez también en *S. marcescens*, en Estados Unidos. Por último, se ha reportado recientemente la variante SME-4 en el mismo microorganismo en Brasil (Cayo et al., 2017). Los genes codificantes de las enzimas SME se localizan en cromosoma, por lo cual ha sido sugerido que los aislamientos de *S. marcescens* portadores del gen codificante de SME constituyan una subespecie que posea naturalmente este marcador de resistencia (Queenan y Bush, 2007). Los BGN productores de estas enzimas están asociados a casos esporádicos o a pequeños brotes hospitalarios (Queenan y Bush, 2007; Rasmussen y Høiby, 2007). La expresión de estas tres clases de enzimas (NMC-A, tipo-IMI y tipo-SME) es inducible (Rasmussen y Høiby, 2007). El perfil de hidrólisis de las mismas incluye penicilinas, cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, carbapenemes, aztreonam. Sin embargo, poseen baja eficiencia de hidrólisis para cefalosporinas de 3ª (e.g. ceftazidima, cefotaxima) y 4ª generación (e.g. cefepime), (Queenan y Bush, 2007).

Otro grupo de carbapenemasas clase A descrito es el grupo GES (Queenan y Bush, 2007; Rasmussen y Høiby, 2007). La primer variante, GES-1, fue identificada en *P. aeruginosa* en 1998 en Guiana, Francia. Las enzimas tipo-GES incluyen al menos 31 variantes siendo algunas de ellas capaces de hidrolizar carbapenemes (e.g. GES-2, -4, -5, -6, -11, -14, -15, -16, -18, -20, -21, y -24). Sin embargo, todas las variantes pueden hidrolizar penicilinas y cefalosporinas, y no hidrolizan aztreonam. Por otro lado, han sido descritas en diversos países como Grecia, Francia, Portugal, Sudáfrica, Japón, Korea, México, Brasil y Argentina, entre otros (Queenan y Bush, 2007; Escandón-Vargas et al., 2016). Estas carbapenemasas han sido recuperadas mayoritariamente de *P. aeruginosa*, así como en enterobacterias y en *A. baumannii* (Escandón-Vargas et al., 2016). Los genes codificantes de estas enzimas se localizan preferentemente en plásmidos.

Por otra parte, las enzimas tipo KPC incluyen al menos 24 variantes (<http://www.lahey.org/studies>), siendo KPC-1 identificada por primera vez en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* en 1996 en Estados Unidos (Queenan y Bush, 2007; Rasmussen y Høiby, 2007). Las enzimas tipo-KPC poseen un amplio perfil de sustrato y son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenemes (Queenan y Bush, 2007; Rasmussen y Høiby, 2007). Las enzimas tipo KPC han sido recuperadas mayoritariamente de *K. pneumoniae*, así como en otras enterobacterias, *P. aeruginosa*, *P. putida* y *A. baumannii*, entre otras, y al presente son las carbapenemasas de clase A más diseminadas en el mundo (Escandón-Vargas et al., 2016). Los genes codificantes de las mismas han sido asociados generalmente a plásmidos (Escandón-Vargas et al., 2016). Las enzimas tipo KPC se asocian a brotes nosocomiales, constituyendo la diseminación de clones particulares de *K. pneumoniae* productores de KPC (principalmente el clon ST258) actualmente un problema emergente en varios países como Estados Unidos, Israel, Grecia, así como en otros países de Europa, América Latina y Asia (Cornaglia et al., 2011; Escandón-Vargas et al., 2016). En nuestro país se detectaron enterobacterias productoras de KPC en al menos 24 centros hospitalarios del país, así como un clon hiper-epidémico de *K. pneumoniae* productor de KPC-2 que constituye el principal responsable de la diseminación intra- e inter- hospitalaria en al menos 10 Hospitales de Buenos Aires (datos del Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), ANLIS Dr. Carlos Malbrán, Buenos Aires, Argentina). Datos reportados por nuestro grupo de trabajo demostraron la diseminación del clon ST258 de *K. pneumoniae* productor de KPC-2 en numerosos centros de salud de Rosario (Ballerini et al., 2011).

La carbapenemasa BKC-1 se informó por primera vez en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* (ST1781) de pacientes hospitalizados en São Paulo, Brasil (Nicoletti et al., 2015). BKC-1 hidroliza penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemes. Hasta la fecha, el gen codificante de BKC-1 ha sido identificado en un plásmido pequeño no conjugativo (Escandón-Vargas et al., 2016). Otra carbapenemasa descrita en los últimos años es BIC-1, enzima recuperada de cepas ambientales de *P. fluorescens* en Francia (Girlich et al., 2010). La enzima BIC-1 es capaz de hidrolizar penicilinas, carbapenemes y cefalosporinas con excepción de ceftazidima y monobactamas (Girlich et al., 2010). Por último, la carbapenemasa tipo-FRI son un grupo de enzimas recientemente descritas. FRI-1 fue reportada por primera vez en 2015 en una cepa clínica de *E. cloacae* en Francia (Dortet et al., 2015), mientras que sus variantes FRI-2 y FRI-4 en cepas clínicas de *E. cloacae* aisladas en Inglaterra y Japón, respectivamente (Kubota et

al., 2018). Estas tres variantes han sido detectadas en plásmidos transferibles (Dortet et al., 2015; Kubota et al., 2018). Las enzimas tipo-FRI hidrolizan penicilinas, carbapenemes y aztronam aunque no confieren resistencia a cefalosporinas tales como ceftazidima, cefotaxima y cefepime (Dortet et al., 2015).

Las carbapenemasas clase D (grupo 2df, Fig. I.3) son también denominadas oxacilinasas (OXA) y fueron descritas por primera vez en un aislamiento de *A. baumannii* productor de OXA-23 en Escocia, en 1985 (Poirel et al., 2010a). Las carbapenemasas tipo-OXA incluyen alrededor de 400 enzimas ampliamente diseminadas en BGN (Nordmann y Poirel, 2014). Estas enzimas, se encuentran agrupadas según su homología de secuencia en al menos 12 subgrupos que incluye a las enzimas de tipo-OXA-23, tipo-OXA-40, tipo-OXA-48, tipo-OXA-51, tipo-OXA-58, tipo-OXA-134a, tipo-OXA-143, tipo-OXA-213, tipo-OXA-214, tipo-OXA-229 y tipo-OXA-235, tipo-OXA-40 (Evans y Aymes et al., 2014). Los genes que las codifican han sido identificados tanto en cromosomas como en plásmidos, y se hallan generalmente asociados a secuencias de inserción (*e.g.* IS*Aba1-4*, IS*Aba9-10*, IS*Aba15*, IS*Aba19*, IS*Aba125*, IS*Aba825*), localizadas corriente arriba de sus genes codificantes, proveyendo así promotores fuertes que favorecen su expresión (Peleg et al., 2010; Ravasi et al., 2011; Evans y Aymes et al., 2014). Las plataformas que colaboran en la diseminación de estos genes de resistencia son generalmente transposones de la familia Tn3 (Poirel et al., 2010a). El perfil de hidrólisis incluye penicilinas, cefalosporinas de 1ª y 2ª generación y carbapenemes, y menos eficientemente a cefalosporinas de espectro extendido (*e.g.* ceftazidima y cefepime) y aztreonam. Suelen presentar una débil actividad carbapenemasa, y para que ocurra resistencia clínica a carbapenemes es necesario la presencia de secuencias de inserción como promotores fuertes, y/o que se combinen otros mecanismos de resistencia como eflujo o impermeabilidad (Queenan y Bush, 2007; Nordmann y Poirel, 2014).

I.3.1.1.2. Carbapenemasas de clase B: MβLs

Las MβLs son enzimas correspondientes a la clase molecular B y al grupo funcional 3 (Fig. I.3). Son capaces de hidrolizar todos los tipos de antibióticos β-lactámicos excepto las monobactamas y su actividad depende de la unión de iones zinc en el sitio activo, por lo que agentes quelantes (*e.g.* EDTA, ácido dipicolínico) pueden inhibir dicha actividad (Walsh et al., 2005; Queenan y Bush, 2007; Bush, 2018).

La primer MβL descrita, BcII, producida por *Bacillus cereus* (bacilo Gram-positivo ambiental) se identificó en 1966 cuando Sabbath y Abraham demostraron que la actividad

cefalosporinasa producida por *B. cereus* era inhibida por EDTA (Bebrone, 2007). Durante las dos siguientes décadas fue el único ejemplo conocido de una MβL codificada en cromosoma y se la consideró una curiosidad bioquímica. Asimismo, otras bacterias ambientales o patógenas oportunistas que raramente causan infecciones en el hombre (*e.g. Stenotrophomonas maltophilia*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Chryseobacterium indologenes*, *Empedobacter brevis*, *Bacteroides fragilis*, entre otras) son productoras de MβLs. En estas bacterias, al igual que en *B. cereus*, los genes codificantes de MβLs integran los cromosomas bacterianos, por lo que se las denomina MβLs endógenas (o ubicuas o residentes) y posiblemente cumplan funciones metabólicas además de inhibir β-lactámicos (Walsh et al., 2005; Bebrone, 2007; Cornaglia et al., 2011). A partir de fines de la década del 80, luego de la incorporación de los carbapenemes a la clínica, se empezaron a reportar distintas MβLs en un número cada vez mayor de cepas de BGN de relevancia clínica como enterobacterias, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Walsh et al., 2005; Bebrone, 2007; Cornaglia et al., 2011). En estos aislamientos clínicos, las MβLs están codificadas por genes heterólogos adquiridos por transferencia horizontal, denominándose las MβLs adquiridas (Walsh et al., 2005; Bebrone, 2007; Cornaglia et al., 2011).

Desde un punto de vista molecular y filogenético, las MβLs comprenden tres subclases, y a su vez cada una de ellas posee diferentes familias. La subclase B1 incluye al menos 21 familias de MβLs, la subclase B2 incluye 3 familias, y la subclase B3 está integrada por al menos 14 familias (Zhao y Hu, 2015). La diversidad en las longitudes de las secuencias primarias de las enzimas y la presencia de varias interrupciones e inserciones en el alineamiento de secuencias resultan problemáticas al momento de comparar las posiciones de los aminoácidos en las secuencias. Con el objeto de facilitar el intercambio de información, se ha adoptado un esquema de numeración estándar para este grupo de enzimas, apoyado en la disponibilidad de estructuras cristalográficas (Galleni et al., 2001).

Las MβLs de subclase B1 incluyen enzimas endógenas de las bacterias que las producen así como enzimas adquiridas (Walsh et al., 2005). Las primeras incluyen a BcII de *Bacillus cereus*, CcrA de *Bacteroides fragilis*, IND-1 de *Chryseobacterium indologenes*, BlaB de *E. meningosepticum*, EBR-1 de *Empedobacter brevis*, JOHN-1 de *Flavobacterium johnsoniae*, CGB-1 de *Chryseobacterium gleum*, MUS-1 de *Myroides odoratimimus*, TUS-1 de *Myroides odoratus*, SFB1 de *Shewanella frigidimarina*, SLB-1 de *Shewanella livingstonensis* (Zhao y Hu, 2015). A su vez, a esta subclase B1 pertenecen las MβLs adquiridas producidas por BGN de importancia clínica, e incluyen las enzimas de las familias IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, DIM,

KHM, FIM, TMB y NDM, las cuales están asociadas en su mayoría en elementos genéticos que las movilizan (*e.g.* plásmidos, transposones). Las MβLs subclase B1 son monoméricas, poseen un peso molecular similar (25-28 kDa), sus secuencias de aminoácidos comparten más del 23% de identidad y pueden unir hasta 2 iones zinc en el sitio activo (Walsh et al., 2005; Bebrone, 2007).

Por otro lado, las MβLs subclase B2 incluyen CphA e ImiS, aisladas de especies de *Aeromonas*, y Sfh-1 de *Serratia fonticola*. Estas enzimas están codificadas en el cromosoma y son poco frecuentes. El alineamiento de las secuencias de estas enzimas con las correspondientes a la subclase B1 muestra un 11% de identidad, a pesar de que presentan un peso molecular muy similar y comparten un ancestro común. Las enzimas de subclase B2 son monoméricas, y comparten los mismos ligandos en el sitio activo que las de subclase B1.

Finalmente, las MβLs subclase B3 son las más distantes desde un punto de vista evolutivo respecto a B1 y B2, con las que comparte unos 9 residuos (Bebrone, 2007). Dentro de la subclase B3 se encuentran las enzimas producidas por BGN que se asocian a infecciones clínicas como L1 de *Stenotrophomonas maltophilia*, enzimas tipo-GOB de *Elizabethkingia meningoseptica*, FEZ-1 de *Legionella gormanii*. Dentro de esta subclase se encuentran asimismo MβLs producidas por bacterias del medio ambiente como THIN-B (de *Janthinobacterium lividum*), Mbl1b (de *Caulobacter crescentus*), BJP-1 (de *Bradyrhizobium japonicum*), CAU (de *Caulobacter vibrioides*), CAR-1 (de *Erwinia carotovora*), y LRA (de bacterias no cultivables) (Zhao y Hu, 2015). Estas enzimas de subclase B3 son monoméricas, a excepción de L1 que es tetramérica, y son endógenas de las bacterias que las producen. Recientemente, se identificaron 5 nuevas enzimas de subclase B3, incluyendo AIM-1 (por “adelaide imipenemase”) producida por *P. aeruginosa*, POM-1 (por *P. otitidis* metallo-β-lactamase) producida por *P. otitidis*, SPR-1 (por *Serratia proteamaculans*) producida por *S. proteamaculans*, PAM-1 (por *P. alcaligenes* MβL), y SMB-1 (por *Serratia* Metallo-β-lactamasa) producida por una cepa clínica de *Serratia marcescens* (Zhao y Hu, 2015). A diferencia del resto de los genes codificantes de las enzimas de subclase B3, los genes *bla*_{AIM-1} y *bla*_{SMB-1} están asociados a elementos genéticos móviles (como *ISCR1*, Zhao y Hu, 2015) por lo cual tienen capacidad de diseminarse.

En base a su especificidad de sustrato, se ha clasificado a las MβLs en sub-grupos funcionales (Fig. I.3; Bush y Jacoby, 2010; Bush, 2018). Las enzimas del subgrupo 3a presentan un amplio espectro de actividad sobre penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes, e incluye a las enzimas B1 y B3. El subgrupo 3b son enzimas que hidrolizan preferencialmente carbapenemes e

incluye a las enzimas B2. Sólo las monobactamas, como el aztreonam, no son hidrolizadas o reconocidas por las MβLs.

I.3.1.1.2.1. Relevancia clínica de las MβLs adquiridas

Las MβLs adquiridas pertenecen mayoritariamente a la subclase B1 (Fig. I.3), sugiriendo que son las más propensas a ser capturadas y diseminadas por transferencia horizontal de genes (THG) que las correspondientes a las otras subclases (Cornaglia et al., 2011). Numerosas familias de MβLs adquiridas han sido descritas desde 1990 e incluyen a las enzimas IMP, VIM, NDM, GIM, DIM, y SIM (y sus variantes) así como SPM-1, KHM-1, FIM-1, TMB-1, y AIM-1 (Zhao y Hu, 2015). La emergencia de BGN de relevancia clínica productores de MβLs adquiridas tuvo lugar hace aproximadamente 3 décadas en cepas de BNF como *P. aeruginosa* y *A. baumannii* del Sudeste Asiático o del Mediterráneo; inicialmente limitados a casos esporádicos o a reducidos brotes nosocomiales (Walsh et al., 2005). No obstante, a partir de mediados de la década del 2000 se observó un incremento progresivo mundial de BGN productores de estas enzimas. Es de destacar también que se han transferido rápidamente a otros BGN de importancia clínica para el hombre como miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y a otros BNF como *Pseudomonas* spp, *Achromobacter* spp, entre otros (Walsh et al., 2005, Zhao y Hu, 2015). Estas enzimas constituyen al presente un mecanismo de resistencia con alta implicancia epidemiológica en los BGN que las producen, y generan un desalentador escenario clínico, al cual se han referido como de “catástrofe clínica” (Walsh et al., 2005, Cornaglia et al., 2011). Se asume que la diseminación de genes de MβLs se ha visto favorecida por el consumo masivo de cefalosporinas de espectro extendido y/o carbapenemes (Cornaglia et al., 2007). La mayoría de los genes de MβLs adquiridas se encuentran documentados en plataformas genéticas localizadas en plásmidos. Sin embargo, secuencias nucleotídicas de plásmidos completos portadores de arreglos genéticos que contienen genes de resistencia a antimicrobianos de relevancia clínica se hallan restringidas a ciertos microorganismos patógenos (Lean y Yeo, 2017; Marquez-Ortiz et al., 2017), siendo aún materia de estudio la caracterización de plásmidos en especies ambientales que pueden constituir reservorios de genes de resistencia.

Las infecciones provocadas por BGN multirresistentes productores de MβLs adquiridas tiene una enorme relevancia clínica debido a numerosos factores, que incluyen: i) la carencia de tratamiento antimicrobiano dado el extendido espectro de acción de las mismas, combinado con la resistencia a otros antimicrobianos (acompañantes) (Walsh, 2005; Oliver, 2009); ii) la

imposibilidad de utilizar inhibidores de uso clínico en combinación con β -lactámicos (Walsh et al., 2005; Oliver, 2009); iii) la diseminación de los genes entre BGN por la elevada asociación a plataformas genéticas móviles (*e.g.* plásmidos, transposones, ISCR, secuencias de inserción) y a integrones (mayoritariamente de clase 1) que favorecen su captura y expresión (y a la de otros genes de resistencia co-residentes en dichos elementos) (Walsh et al., 2005; Oliver, 2009; Poirrel et al., 2006, Tato et al., 2010); iv) la capacidad de clones particulares de BGN productores de M β LS en provocar brotes nosocomiales (Walsh et al., 2005; Oliver, 2009, Queenan y Bush, 2007); v) su asociación a una mayor mortalidad en pacientes con infecciones nosocomiales por cepas productoras de M β LS (Walsh et al., 2005, Cornaglia et al., 2011). Las causas de mortalidad se relacionaron con sepsis y tratamientos empíricos inapropiados dentro de las 72 hs de declarada la infección. Estos factores señalan la necesidad de detección temprana y caracterización de las cepas o clones específicos productores de M β LS así como los elementos genéticos vinculados a la diseminación de dichos determinantes de resistencia, a fin de evitar diseminación, fallas de tratamiento y mortalidad asociada (Cornaglia et al., 2007). Así, la caracterización de los EG que diseminan los genes de resistencia es esencial para proveer estrategias a futuro tendientes a limitar su profusa transferencia entre bacterias que comparten ciertos nichos (*e.g.* bacterias intestinales; bacterias de ámbitos nosocomiales; bacterias de nichos ambientales, etc). Esta información es necesaria para que drogas, aún experimentales, puedan ser desarrolladas para el control de la promiscuidad, penetrabilidad, persistencia, y plasticidad (4 Ps) de elementos genéticos que codifican determinantes de resistencia (Baquero et al., 2011)

I.3.1.1.2.2. Epidemiología de las M β LS

Las M β LS más reportadas a nivel mundial corresponden a las familias IMP, VIM y NDM, esencialmente sus variantes IMP-1, VIM-2 y NDM-1 (Mojica et al., 2016). Las enzimas de la familia IMP (por Imipenemasa) fueron descriptas inicialmente en *P. aeruginosa* en Japón, en 1988. Al presente, han sido depositadas 64 variantes en la base de datos del NCBI, siendo IMP-64 la última en reportarse (López-García et al., 2018). Sin embargo, no hay publicaciones disponibles sobre numerosas variantes (*e.g.* IMP-17, -23, -36, -39, -46, -47, -50, -52/-54, -57/-61, -63). Las imipenemasas están ampliamente diseminadas en Japón y Korea, aunque también se han reportado en países de Europa, Oceanía, otros países de Asia, y América (Fig.I.5; Mojica et al., 2016) siendo IMP-1 la más reportada (Zhao y Hu, 2011a). Las variantes de IMP han sido descriptas en al menos 26 especies clínicamente importantes, mayormente en *P. aeruginosa*

(especialmente pertenecientes a complejos clonales CC111 y CC235), *A. baumannii*, Andy enterobacterias, aunque han sido ocasionalmente identificado en otros microorganismos (e.g. *P. putida*) (Zhao y Hu, 2015; Escandón-Vargas et al., 2016; Mojica et al., 2016). Además, los BGN productores de IMP fueron detectados en más de 24 países, siendo la familia de MβLs mas reportada en Asia (Zhao y Hu, 2015).

Las enzimas tipo-VIM son uno de los grupos de MβLs adquiridas más reportado en el mundo. La primera descrita fue VIM-1 (por Verona Imipenemasa), aislada de *P. aeruginosa* en Verona, Italia, en 1997 (Lauretti et al., 1998). Esta enzima se diseminó luego a otros BNF (e.g. *P. putida* y *A. xylosoxidans*), y posteriormente a enterobacterias (Walsh et al., 2005). Al presente, se han depositado 62 alelos codificantes de enzimas tipo-VIM en la base de datos del NCBI (GenBank). Sin embargo, no hay publicaciones disponibles para algunos alelos (e.g. codificantes de VIM-21, -22, -40/-43, -46, -48/62) (Zhang et al., 2017b). Las enzimas tipo-VIM están distribuidas en 40 países (Fig. I.5) y producidas por al menos 23 BGN diferentes (Zhao y Hu, 2015). En particular, VIM-2 se describió por primera vez en 1996, en Francia, en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa*. Esta variante fue posteriormente descrita en *P. aeruginosa* en diversos países (e.g. Grecia, Italia, Japón, Korea, Portugal, España, Croacia, Polonia, Chile, Venezuela, México, USA y Argentina). Se ha reportado asimismo en aislamientos de enterobacterias incluyendo *E. cloacae*, *S. marcescens*, *C. freundii*, y en los BNF *A. baumannii*, y *Pseudomonas* spp. (*P. putida* y *P. fluorescens*), entre otros. Al presente, VIM-2 es la variante de más amplia distribución en el mundo asociada a aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* (Cornaglia et al., 2011, Zhao y Hu, 2011b, Nordmann y Poirel, 2014). Aun así, otras especies de *Pseudomonas* (e.g. *P. putida*) han sido descritas como productoras de VIM-2, algunas de ellas consideradas reservorios del gen codificante de dicha enzima (Juan et al., 2010; Marchiaro et al., 2014a).

La enzima NDM-1 (por New Delhi MβL) fue detectada por primera vez en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* en India, 2008 (Yong et al., 2009). Al presente, cepas productoras de NDM-1 son endémicas en India y China, y a solo una década de su detección se ha reportado en todo el mundo (Khan et al., 2017). Se ha estimado que el subcontinente indio es el principal reservorio de microorganismos productores de NDM-1, basado en el número de víctimas afectadas con cepas productoras de NDM-1 en el mundo. Sin embargo, numerosos países de Europa, Asia, América y Oceanía serían reservorios secundarios de los genes *bla*_{NDM} (Khan et al., 2017). Al presente, se han depositado 24 variantes de enzimas tipo-NDM en la base

de datos del NCBI (GenBank). Sin embargo, no hay publicaciones disponibles para algunos alelos (e.g. codificantes de NDM-18, -22/24) siendo NDM-21 la última caracterizada (Liu et al., 2018) y datos epidemiológicos muestran que esta familia de enzimas se encuentra diseminada a nivel global (Fig. I.5; Mojica et al., 2016). No obstante, NDM-1 sigue siendo prevalente, siendo esporádica la identificación de sus variantes. Las especies productoras de NDM mayormente detectadas son *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, seguido por *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Moraxella* spp., y *Citrobacter* spp. (Berrazeg et al., 2014; Wu et al., 2019). Entre los microorganismos prevalentes, se han reportado diversos clones epidémicos que incluye a *K. pneumoniae* ST11 y ST147, y *E. coli* ST131 y ST101 (Logan y Weinstein, 2017). Además, bacterias productoras de NDM de numerosas especies de *Acinetobacter* se han encontrado en fuentes naturales incluyendo ríos, aguas residuales, aves de corral, y mascotas mostrando así su diseminación a través de nichos ambientales (Khan et al., 2017; Wu et al., 2019). Es interesante destacar que la mayoría de las variantes de NDM han sido detectadas en enterobacterias, siendo NDM-2 y NDM-14 detectadas solo en *Acinetobacter* spp. (Khan et al., 2017; Liu et al., 2018). Esta amplia diseminación global de las variantes de NDM ha sido posible debido a su asociación a EGM. En este sentido, se ha propuesto que la transmisión horizontal de *bla*_{NDM-1} ha sido facilitada debido a su asociación al transposón Tn*I25*, lo que ha permitido su diseminación global entre enterobacterias y BNF, así como en diferentes nichos ya sea ambientales como clínicos (Poirel et al., 2011; Khan et al., 2017). Dado que IS*AbaI25* (que flanquea al Tn*I25*) es esencialmente hallada en *Acinetobacter* (Mussi et al., 2005; Poirel et al., 2012), ha sido sugerido que la diseminación de *bla*_{NDM-1} se originó desde este género bacteriano (Poirel et al., 2012).

El resto de las familias de MβLs presentan en su mayoría un único miembro y están restringidas a áreas geográficas concretas (Zhao y Hu, 2015). La enzima SPM-1 (San Pablo MBL) ha sido aislada inicialmente de *P. aeruginosa* en Brasil, en 1997 (Toleman et al., 2002). Se reportó que el 54% de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem, en Brasil, son productoras de SPM-1 (Zhao y Hu, 2015). Además, han sido descritos algunos escasos aislamientos conteniendo el gen *bla*_{SPM-1} fuera de Brasil, e.g. *P. aeruginosa* en Suiza, en 2007, recuperado de un paciente previamente internado en Brasil (Salabi et al., 2011), en cepas MR de *A. baumannii* en Irán (Shahcheraghi et al., 2011) y en Argentina (Marchiaro et al., 2014b). La enzima GIM-1 (por German Imipenemasa) se ha reportado inicialmente, en 2002, en

Alemania de aislamientos de *P. aeruginosa* (Castanheira et al., 2004), y posteriormente en aislamientos de *P. putida*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *Citrobacter freundii* y *A. pittii* (Zhao y Hu, 2015). Luego, en 2015 se caracterizó la variante GIM-2 en una cepa clínica de *E. cloacae* (Wendel y MacKenzie, 2015). La enzima SIM-1 (por Seúl Imipenemasa) fue descrita en aislamientos de *A. baumannii* en Korea, en 2005 (Lee et al., 2005), y posteriormente en enterobacterias en India (Cornaglia et al., 2011). Recientemente, se describió la variante SIM-2 recuperada de una cepa clínica de *P. aeruginosa* en China (Sun et al., 2015). La carbapenemasa AIM-1 ha sido reportada en *P. aeruginosa* en Australia, en 2007 (Yong et al., 2007). Por su parte, KHM-1 (por Kyorin Health Science MBL) ha sido detectada en *Citrobacter freundii* en Japón, en 2008 (Sekiguchi et al., 2008); DIM-1 (por Dutch imipenemase) en *Pseudomonas stutzeri* en Holanda, en 2010 (Poirel et al., 2010b), y DIM-2 aislada de un aislamiento clínico de *P. putida*, en 2010 (Poirel et al., 2010b; Sun et al., 2015); TMB-1 (por Tripoli MBL) se identificó en un aislamiento clínico de *A. xylosoxidans* en Libia (El Salabi et al., 2012), y por último, FIM-1 (por Florence imipenemase) detectada en una cepa de *P. aeruginosa* en Italia (Pollini et al., 2013).

Los datos epidemiológicos de la distribución mundial de las principales MBLs adquiridas muestra que las enzimas tipo-IMP, -VIM y -NDM son las mayormente reportadas (Fig. I.5; Mojica et al., 2016). Un análisis detallado reveló que estas tres clases de enzimas fueron reportadas en gran parte de América, Europa, Asia y Oceanía mientras que la combinación de dos de las tres enzimas o las enzimas por separado fueron escasamente reportadas a nivel global (Fig. I.5; Mojica et al., 2016). En Argentina se han detectado al presente aislamientos clínicos de BGN productores de MBLs de las familias VIM, IMP, SPM-1 y recientemente NDM-1 (Pasteran et al., 2005; Gomez et al., 2011; Marchiaro et al., 2014a; Marchiaro et al., 2014b; Escandón-Vargas et al., 2016), siendo las enzimas tipo-VIM las más frecuentes con predominio de VIM-2 (Marchiaro et al., 2014a). Los datos epidemiológicos nacionales documentan que las variantes de MBLs descritas al presente incluyen las enzimas IMP-13, IMP-16, VIM-2, VIM-11 y SPM-1 producidas por *P. aeruginosa*, VIM-2 recuperada de *P. putida*, enzimas tipo-IMP en *Acinetobacter* spp, e IMP-8 y VIM-2 de enterobacterias, VIM-16 en *S. marcescens*, NDM-1 en *Providencia rettgeri*, *A. junii*, *A. ursinguii*, *A. schindleri* (Pasteran et al., 2005; Almuzara et al., 2007; Radice y Gutkind, 2007; Cejas et al., 2008; Fiorilli et al., 2010; Gomez et al., 2011; Nastro et al., 2013; Pasteran et al., 2014; Marchiaro et al., 2014a; Vilacoba et al., 2014; Montaña et al., 2016; Montaña et al., 2017; Elena et al., 2018; Almuzara et al., 2018; Faccone et al., 2019).

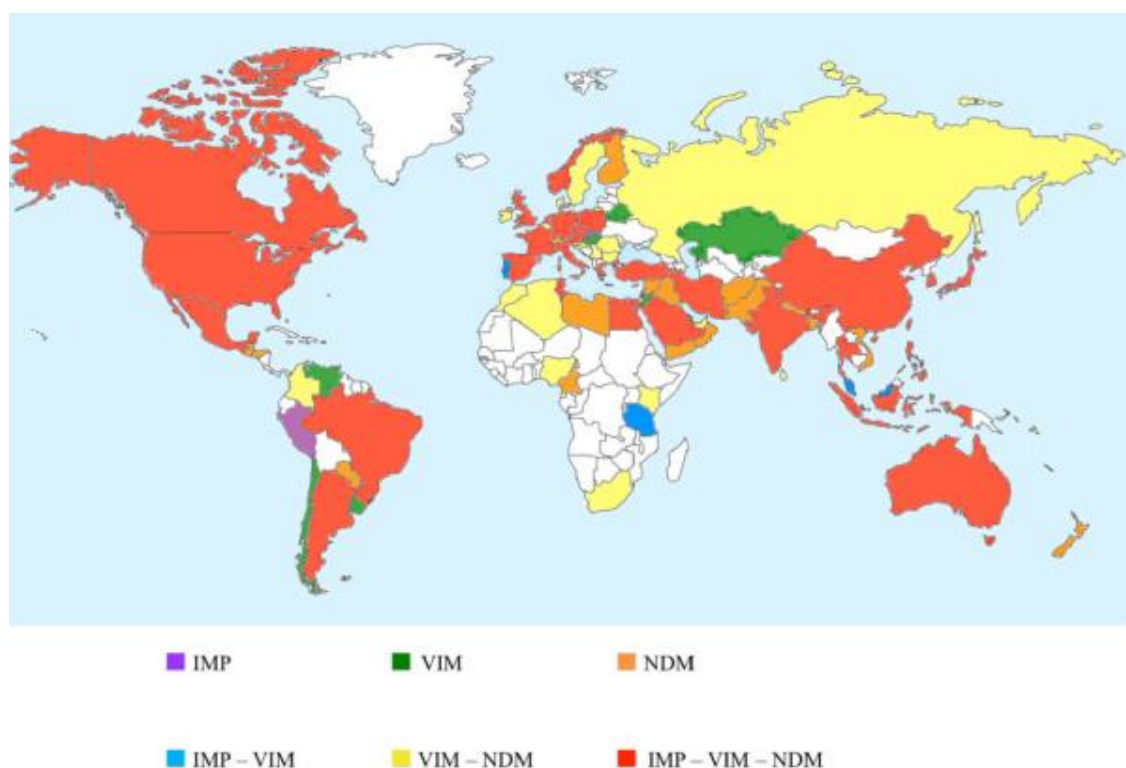


Figura I.5. Distribución global de las principales MβLs adquiridas. Sólo fueron empleados artículos que reportaron la presencia de productores de IMP, VIM y NDM. Figura adaptada (Mojica et al., 2016).

I.3.1.1.2.3. Emergencia de Bacilos no Fermentadores portadores de MβLs

Las MβLs adquiridas constituyen determinantes de resistencia emergentes en BNF (Escandon-Vargas et al., 2016; Mojica et al., 2016; Wu et al., 2019). Entre las distintas familias de MβLs las variantes de IMP y VIM, y NDM-1 son las más profusamente diseminadas, asociadas a BNF, principalmente a *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Walsh et al., 2005; Cornaglia et al., 2007; Fiorilli et al., 2010; Gomez et al., 2011; Marchiaro et al., 2010; Zhao y Hu, 2012a; Logan y Weinstein, 2017). En los últimos años se han reportado otros BNF productores de enzimas tipo -VIM, -IMP y NDM incluyendo *A. ursingii*, *Acinetobacter* “NB14”, *P. fulva*, *P. fluorescens*, y *P. putida*, entre otros (Almuzara et al., 2007; Espinal et al., 2015; Faccone et al., 2019). En general, estas especies bacterianas son ambientales, aunque consideradas patógenos oportunistas por su asociación a infecciones clínicas en la actualidad (Juan et al., 2010; Marchiaro et al., 2014a). La detección de cepas de *P. putida* productoras de MβLs parece restringida a algunas regiones del mundo (Almuzara et al., 2007; Juan et al., 2010; Santos et al., 2010; Marchiaro et al., 2014a), o alternativamente, subdiagnosticada. En este contexto, la profundización de la caracterización molecular de las especies de *P. grupo putida* portadoras de plataformas con genes codificantes de MβLs proveerá evidencias de los mecanismos de

diseminación de dichas plataformas genéticas dentro de las especies del grupo, como a otras especies filogenéticamente más lejanas.

Reportes actuales indican que miembros de *Acinetobacter* spp., incluyendo *A. baumannii*, *A. bereziniae*, *A. lwoffii*, *A. pittii* son los principales BNF productores de NDM-1 (Pfeifer et al., 2011; Poirel et al., 2012; Hu et al., 2012; Chen et al., 2012; Sun et al., 2013; Zhang et al., 2014; Jones et al., 2015; Wu et al., 2019) y posibles reservorios de β -lactamasas (Zhao y Hu, 2012).

Así, datos actuales muestran la emergencia de BNF productores de M β Ls y la asociación de genes codificantes de M β Ls a plataformas móviles que puedan ser transferidas a patógenos nosocomiales es aún un tema de estudio. En este contexto, se seleccionaron para este Trabajo de Tesis aislamientos clínicos de *P. grupo putida* productores de VIM-2, y *A. bereziniae* productor de NDM-1 como modelos de estudio. Ambos grupos bacterianos seleccionados están ligados filogenéticamente a los patógenos nosocomiales más importantes, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, respectivamente; y son productores de M β L prevalentes en Argentina, y en el mundo, como VIM-2 y NDM-1, respectivamente. Los mecanismos asociados a la diseminación de plataformas genéticas portadoras de *bla*_{VIM-2} entre distintas especies del género *Pseudomonas*, así como a la diseminación de plataformas portadoras de *bla*_{NDM-1} entre especies de *Acinetobacter* spp. es aún materia de estudio, y se intentarán dilucidar en este trabajo.

I.4. Mecanismos de diseminación de genes de resistencia en BGN

La captura, acumulación y diseminación de genes de resistencia entre BGN se debe principalmente a su asociación a los denominados elementos genéticos móviles (EGM), término utilizado para referirse a los elementos que promueven la movilidad intracelular del ADN (*e.g.*, entre plásmidos, del plásmido a cromosoma o viceversa) como así también a aquellos que permiten la movilidad intercelular del ADN (Partridge et al., 2018). Entre los elementos que permiten la movilización de genes de resistencia intracelularmente se encuentran las secuencias de inserción (IS) y los transposones (Tn). Estos elementos están constituidos por segmentos de ADN que tiene la capacidad de moverse (y los genes de resistencia asociados) autónomamente desde una región genómica a otra dentro de la misma célula (Partridge et al., 2018). Otros elementos, como los integrones (In), utilizan la recombinación sitio específica para mover casetes de genes de resistencia entre sitios definidos (Di Conza y Gutkind, 2010; Partridge et al., 2018). Como estos tipos de elementos a menudo están presentes en múltiples copias en diferentes ubicaciones en un genoma, también pueden facilitar la recombinación homóloga (Partridge et al., 2018). Los mecanismos intercelulares de intercambio genético por THG incluyen

conjugación/movilización, mediada por plásmidos y elementos conjugativos integrativos (ICE); transducción, mediada por bacteriófagos; transformación, que media la captación de ADN extracelular; conducción; y fusión célula-célula en comunidades microbianas como el biofilm (Frost et al., 2005; Norman et al., 2009; Davies J. y Davies D., 2010; Partridge et al., 2018). Así, el fenómeno de THG supone una fuerza evolutiva importante en la organización, adaptación y especialización de los genomas bacterianos en diversos nichos ambientales (Norman et al., 2009).

I.4.1. Estructuras genéticas que participan en la movilización de genes de resistencia dentro de la célula

I.4.1.1. Secuencias de inserción y transposones

Las IS y los Tn son elementos genéticos transponibles que están involucrados en la diseminación de genes de resistencia al insertarse en EGM, como plásmidos (Gillings et al., 2008; Di Conza y Gutkind, 2010; Partridge, 2011; Partridge et al., 2018). Estos elementos son capaces de insertarse en diferentes sitios de los genomas bacterianos. Un caso extremo es representado por el Tn7, el cual posee preferencia por un solo sitio de inserción en el cromosoma (Craig, 1997). Sin embargo, las IS y restantes transposones tienen numerosos posibles lugares de inserción dependiendo de la estructura o sitio funcional del blanco de ADN (Craig, 1997).

Los principales tipos de elementos transponibles asociados en la captura y movilización de genes de resistencia a antibióticos en BGN son las IS (Partridge, 2011); y transposones compuestos, formados por una región central variable y flanqueados por IS (Snyder y Champness, 2007), transposones de las familias Tn3 (Partridge, 2011), y los derivados del Tn402/Tn5090 (Radström et al., 1994; Kholodii et al., 1995) (Fig. I.6). Estos elementos tienen algunas características en común, pero capturan y/o mueven genes por diferentes mecanismos (Partridge, 2011).

Las IS “clásicas” son elementos móviles constituidos por secuencias de ADN que codifican para una transposasa (*tnpA*), cuyo gen se encuentra flanqueado en ambos extremos generalmente por secuencias repetidas invertidas (IR_L e IR_R por “repeticiones invertidas left o izquierda y right o derecha, respectivamente; Fig. I.6). El reconocimiento de la IRs por la transposasa permite la movilidad de la IS a una nueva ubicación mediante un procesos de “cortar y pegar”, según la IS en particular (Partridge, 2011). El evento de transposición de la mayoría de las ISs genera repeticiones directas (DR) de 2 a 14 pb (Fig. I.6; Partridge, 2011). Numerosas IS proveen un promotor fuerte que permite la expresión o sobre-expresión de los genes de resistencia capturados (e.g. IS*Aba125* corriente arriba de *bla*_{NDM-1} en *Acinetobacter* spp., Poirel et

al., 2011; Hu et al., 2012; Jones et al., 2015; IS*Aba825* corriente arriba de *bla*_{OXA-58}, Ravasi et al., 2011). Por otro lado, existen otros tipos de IS, como los elementos tipo-*ISEcp1* y los ISCR (“insertion sequences common region”), los cuales pueden capturar regiones de ADN adyacentes, incluyendo genes de resistencia, y movilizarlos como una unidad (Fig. I.6; Partridge, 2011). Los elementos tipo-*ISEcp1* están flanqueados por IR de 14 pb, aunque a diferencia de las IS “clásicas”, se movilizan moviendo regiones adyacentes al no reconocer la IR_R y, en cambio, utiliza una secuencia de ADN corriente abajo relacionada débilmente (designada como IR_{alt} por “alternativo”; Fig. I.6) en combinación con IR_L (Poirel et al., 2003, Lartigue et al., 2006). Los elementos ISCR son similares a una familia de IS que incluye a *IS91*, *IS801* e *IS1294*, que se movilizan a través de un mecanismo de replicación en círculo rodante (Garcillán-Barcia et al., 2002). Los ISCR parecen moverse de la misma manera (Toleman et al., 2006) y se ha sugerido el nombre de *rcr* (por “rolling circle replicase”) para el gen de sus transposasas (Fig. I.6; Levings et al., 2008). Los genes *rcr* están bordeados por un sitio de origen (*oriIS*) corriente abajo y un sitio de terminación (*terIS*) corriente arriba, en lugar de las IRs típicas de las IS “clásicas”, y no generan DR (Fig. I.6; Partridge, 2011). Al igual que *IS91* (Garcillán-Barcia et al., 2002) e *IS1294* (Tavakoli et al., 2000), los elementos ISCR parecen movilizar genes al no reconocer el *terIS* y continuar la replicación en regiones de ADN adyacentes (Toleman et al., 2006).

Los transposones compuestos están formados por dos copias de la misma IS “clásica”, o dos IS estrechamente relacionadas, que pueden capturar genes, generalmente de resistencia a antibióticos, y movilizarse como una unidad (Fig. I.6; Partridge, 2011). Por su parte, la familia de transposones Tn3 (Partridge, 2011) incluye dos subgrupos, transposones tipo-Tn3 y tipo-Tn21; ambos flanqueados por IRs de 38 pb e incluyen *tnpA*, gen codificante de la transposasa; *tnpR*, gen cuyo producto es una resolvasa; y un sitio de resolución o *res* (Fig. I.6; Partridge, 2011). Estos transposones se mueven por un proceso replicativo que implica el reconocimiento de las IRs por parte de TnpA y la generación de un producto intermedio cointegrado que se resuelve en el sitio *res* mediado por la acción de TnpR (Partridge, 2011). Los dos subgrupos se distinguen por diferencias tanto en la secuencia de ADN como por la organización genética de sus genes. En los miembros del subgrupo tipo-Tn3, el sitio *res* se ubica entre *tnpA* y *tnpR*, quienes se encuentran en direcciones opuestas (Fig. I.6; Partridge, 2011). En los transposones del subgrupo tipo-Tn21 (Partridge, 2011), *tnpA* y *tnpR* exhiben la misma orientación, y el sitio *res* es adyacente al codón de inicio de *tnpR* (Fig. I.6). Por último, los transposones de la familia del Tn5053 que incluye al Tn402/Tn5090 están compuestos por cuatro genes incluyendo *tniA* y *tniB*, cuyos productos

proteicos actúan cooperativamente para formar la transposasa activa TniAB; *tmiQ*, gen codificante de una proteína accesoria a la transposición; y *tmiC* (o *tmiR*), cuyo producto proteico es una invertasa/resolvasa de la familia de recombinasas sitio-específicas; el sitio de resolución o *res* ubicado entre los genes *tmiC* y *tmiQ*, y las IRs de 25 pb flanqueando toda la estructura (Fig. I.6; Radström et al., 1994; Kholodii et al., 1995; Partridge, 2011). Estos transposones se mueven de manera similar a los miembros de la familia Tn3 mediando la formación de un cointegrado, que se resuelve por recombinación en el sitio *res* por acción de TniR (Kholodii et al., 1995; Kamali-Moghaddam y Sundstrom, 2000).

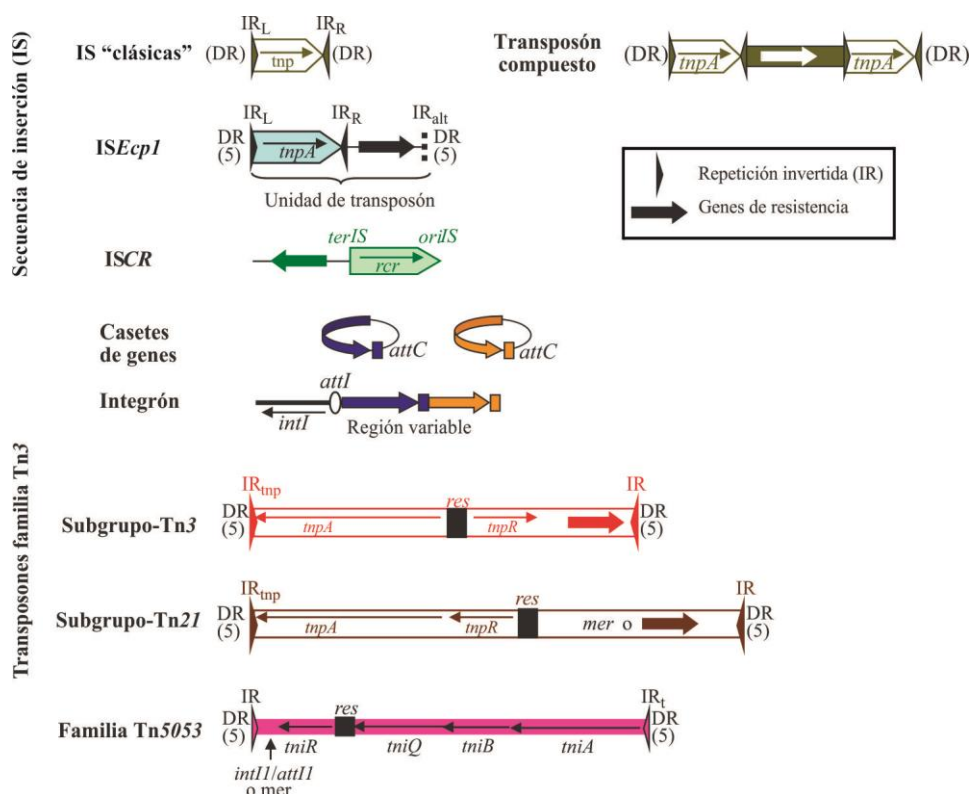


Figura I.6. Representación esquemática de las distintas clases de IS y transposones. Figura adaptada (Partridge et al., 2011).

I.4.1.1.1. ISCR y transposones asociados a la diseminación de MβLs en BGN

Las ISCR y los transposones (compuestos, y de familias Tn3 y Tn5053) pueden participar en la movilización de genes de resistencia, asociados o no a integrones. Entre las diferentes variantes de ISCR descritas asociadas a genes de resistencia, se detectaron algunas vinculadas con la diseminación de MβLs incluyendo ISCR1 a SMB-1, ISCR2 a IMP-1, ISCR3 a VIM-1, ISCR4 a SPM-1, ISCR11 a VIM-2, ISCR15 a AIM-1 e ISCR19 a FIM-1 (Toleman et al., 2006, Partridge, 2011; Wachino et al., 2011; Zhao y Hu 2015). Aun así, la asociación de estas estructuras a genes de MβLs continúa siendo al presente poco descripto. Transposones

compuestos vinculados con la diseminación de *bla*_{NDM-1} han sido reportados, incluyendo el transposón compuesto flanqueado por IS903 (Sekizuka et al., 2011), el flanqueado por IS26 (Ho et al., 2010), Tn3000 (Campos et al., 2015), y Tn125 (Poirel et al., 2012). Por su parte, transposones de ambos subgrupos de la familia Tn3 han sido asociados usualmente a diferentes genes de resistencia, fundamentalmente a aquellos codificantes de SβLs (Poirel et al., 2010a; Partridge, 2011; Nicolas et al., 2015; Partridge, 2018). Sin embargo, su asociación a MβL ha sido escasamente descripta. Ejemplos de estos últimos incluyen a *bla*_{VIM-2} identificado en el Tn1332 (subgrupo Tn3; Poirel et al., 2006), y *bla*_{NDM-1} detectado en un transposón tipo-Tn3 (Villa et al., 2012). Por su lado, transposones Tn402/Tn5090 correspondientes a la familia Tn5053, defectivos en el módulo de transposición (*tni*) han sido usualmente reportados asociados a las principales familias de MβL adquiridas incluyendo IMP y VIM. En contraposición, dichos elementos genéticos con módulo *tni* completo han sido escasamente reportados asociados a MβL. Recientemente, nuestro grupo de trabajo y otros autores han reportado la caracterización de estos últimos, asociados a genes codificantes de VIM-2 (Juan et al., 2010; Marchiaro et al., 2014b).

I.4.1.1.1.1. Diseminación de *bla*_{NDM-1} a través del transposón compuesto Tn125

En la actualidad, la MβL emergente es NDM-1 y se ha hipotetizado que una de las razones de su extensa diseminación es su asociación a diferentes EGM (Dortet et al., 2014). El Tn125 es un transposón compuesto flanqueado por dos copias de IS*Aba125*, hallado por primera vez en el cromosoma de la cepa clínica *A. baumannii* 161/07 interrumpiendo un gen denominado *msf*, codificante de un transportador de membrana (Pfeifer et al., 2011). En esta cepa se detectaron asimismo las DR de 3 pb bordeándolo, evidenciando su reciente adquisición (Pfeifer et al., 2011). La caracterización del Tn125 reveló una estructura de 10.099 pb formada por los elementos IS*Aba125*-*bla*_{NDM-1}-*ble*-*trpF*-*dsbC*-*cutA*-*groES*-*groEL*-ISCR21-Δ*pac*-IS*Aba125* (Fig. I.7.; Poirel et al., 2012). Corriente abajo de *bla*_{NDM-1} se encuentra el gen *ble*, codificante del factor de resistencia a la droga antitumoral bleomicina; *trpF*, cuyo producto proteico es la fosforibosil antranilato isomerasa la cual cataliza un paso en la biosíntesis del triptofano; *dsbC*, codificante de una isomerasa de puentes disulfuros, la cual colabora en el correcto plegamiento de proteína oxidadas; *cutA*, cuyo producto proteico está involucrado en la tolerancia celular a una amplia variedad de cationes divalentes distintos del cobre; *groES* y *groEL*, codificantes de las chaperonas GroES y GroEL involucradas en el plegamiento correcto de proteínas; ISCR21 codificante de una transposasa tipo-ISCR; y por último el gen *pac* deletado (Δ*pac*), siendo *pac* codificante de una acetiltransferasa (Poirel et al., 2012). La IS*Aba125* que bordea a dicho

elemento fue descrita por primera vez en 2005 (Mussi et al., 2005), y estudios actuales muestran que es un elemento prevalente del género *Acinetobacter*, encontrado a su vez en múltiples copias en *A. baumannii* (Adams et al., 2016). El análisis de la región corriente arriba de *bla*_{NDM-1} mostró que su expresión estaba bajo el control del promotor fuerte cuya secuencia -35 se encuentra en la IRL de *ISAbal25* (Poirel et al., 2012). A partir de su primer reporte, el Tn125 ha sido detectado en cepas clínicas de *Acinetobacter* spp. en cromosoma (Poirel et al., 2012) como en plásmidos (Hu et al., 2012; Yang et al., 2012; Zong et al., 2013; Zhou et al., 2015; Jones et al., 2015; Brovedan et al., 2015; Zou et al., 2017). El primer plásmido conjugativo identificado en este grupo bacteriano fue pNDM-BJ01 recuperado de una cepa clínica de *A. lwoffii* (Hu et al., 2012). Luego, variantes del plásmido pNDM-BJ01 han sido detectadas en otras especies de *Acinetobacter* spp (Jones et al., 2015). Por otro lado, en *Enterobacteriaceae* han sido halladas usualmente plataformas portadoras del gen *bla*_{NDM-1} con restos del Tn125 (Δ Tn125), en plásmidos de al menos 20 diferentes grupos de incompatibilidad, incluyendo asimismo un derivado del pNDM-BJ01 (Poirel et al., 2012; Logan y Weinstein, 2017; Paskova et al., 2018, Wu et al., 2019) que muestra así su extensa movilización. Estas observaciones llevaron a proponer que el Tn125 sería uno de los responsables esenciales de la diseminación de *bla*_{NDM-1} en *Acinetobacter* spp. y en *Enterobacteriaceae* (Pfeifer et al., 2011; Poirel et al., 2012; Bontron et al., 2016). Asimismo, se ha propuesto fuertemente que *A. baumannii* es un reservorio de genes *bla*_{NDM} sugiriendo que esta especie constituiría un aceptor final de dichos genes de resistencia, y adquiriría asimismo otros determinantes de resistencia para luego transferirlos a enterobacterias y *Pseudomonas* spp (Dortet et al., 2014). Si otras especies de *Acinetobacter* spp. constituyen reservorios de *bla*_{NDM-1} (quienes podrían transferir dichas plataformas a *A. baumannii*) es aún materia de estudio.

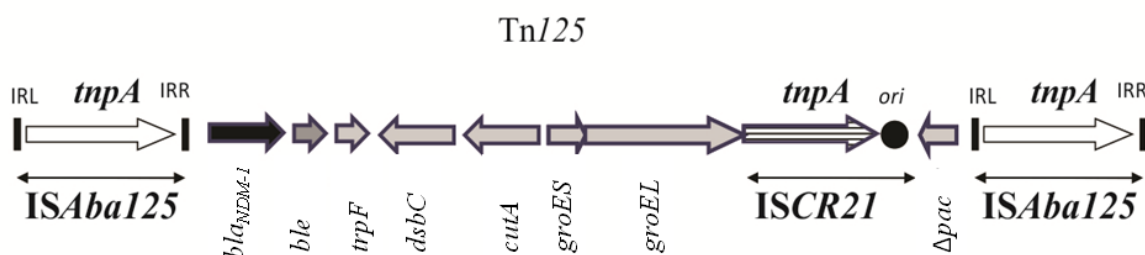


Figura I.7. Representación esquemática del Tn125. Los genes y su dirección de transcripción están indicados con flechas. *tnpA*, gen codificante de transposasa; *ble*, gen codificante de la enzima que confiere resistencia a bleomicina; *trpF*, codifica para N-(5'-fosforribosil) antranilato isomerasa; *dsbC*, codifica para translocador de arginina; *cutA*, codifica para una proteína que confiere resistencia a cationes divalentes; *groES* y *groEL*, codifican para proteínas chaperonas; ISCR21: IS de tipo “rolling circle”; *ori*, origen de replicación de ISCR21, *Δpac*, gen codificante de una acetil fosfotransferasa (truncado); IRL e IRR, IR izquierda y derecha, respectivamente. Figura adaptada (Bonin et al., 2012).

I.4.1.2. Integrones

Los integrones son una familia diversa de elementos genéticos no móviles, capaces de capturar genes de resistencia bajo la forma de casetes, mediante eventos de recombinación sitio-específica, y facilitar la expresión de los mismos (Mazel, 2006; Di Conza y Gutkind, 2010; Gillings, 2014; Partridge et al., 2018). Los integrones se caracterizaron como dos grupos, integrones “móviles”, los cuales asociados a EGM son elementos prevalentes involucrados en la diseminación de genes de resistencia; y los “superintegrones”, de localización cromosómica asociados inusualmente a genes de resistencia (Gillings, 2014). Esta distinción se ha basado en un conjunto limitado de ejemplos. Al presente se distinguen distintas estructuras de integrones entre estos dos extremos. Así, pueden ser distinguidos en función de la homología relativa del gen de la integrasa, *intI*, en 3 grandes grupos basados en la filogenia de los genes codificantes de las integrasas: (i) un grupo de integrones hallado en proteobacterias de ambientes de agua dulce y suelo, que también incluye integrones de clase 1 y 3 asociados a bacterias clínicamente significativas; (ii) un grupo encontrado en gammaproteobacterias de ambientes marinos, que incluye integrones de clase 2 así como integrones encontrados en el elemento conjugativo integrativo SXT y en el plásmido pRSV1 de *Vibrio*; y (iii) integrones cuyas integrasas están en orientación inversa a los mencionados (Gillings, 2014).

La estructura mínima de un integrón necesaria para la adquisición de genes en casete mediante recombinación específica de sitio y para su expresión incluye, el gen codificante de la integrasa (*intI*), un sitio adyacente de recombinación (*attI*) que es reconocido por la integrasa, y promotores (Pc, P2) orientados para la expresión de los genes capturados. El gen *intI* contiene su propio promotor (PI) y, en general, se expresa en forma divergente a los genes capturados. La integrasa, perteneciente a la familia de las tirosina-recombinasas, es la implicada en la recombinación sitio-específica de casetes de genes de resistencia, y no solo cataliza la integración de casetes de genes sino también la escisión de los mismos. Así, la recombinación se produce entre el sitio *attI* con el sitio *attC* del casete de gen de resistencia. Un casete de genes es un elemento pequeño (de 0,5 a 1 kpb) que consiste en un solo gen (ocasionalmente dos), un sitio de recombinación *attC* y habitualmente carece de promotor. Los casetes de genes pueden existir en forma circular libre. Sin embargo, no son replicativos y generalmente se encuentran insertados en un integrón (Partridge et al., 2018).

Las diferentes secuencias de integrasa han definido las diferentes clases de integrones (Mazel, 2006). Así, han sido descriptos al presente al menos 5 clases de integrones, si bien los de

clases 1, 2 y 3 son los mejor caracterizados (Mazel, 2006; Di Conza y Gutkind, 2010; Gillings, 2014). Específicamente, los de clase 1 son los prevalentes en BGN multirresistentes aislados en la clínica. Los integrones de clase 1 contienen dos segmentos conservados, en el extremo 5' y en el extremo 3', que flanquean una región central en la cual se insertan los casetes de genes de resistencia, denominada región variable (Fig. I.8). El segmento conservado del extremo 5' (5'CS) porta el gen *intI1*, el sitio adyacente de recombinación *attI1*, y los promotores P_i y P_c . El segmento del extremo 3' de estos integrones está menos definido (Mazel, 2006; Di Conza y Gutkind, 2010; Gillings, 2014). Mayoritariamente, los integrones de clase 1 denominados clínicos o clásicos presentan un segmento conservado 3' (3'CS), e incluyen un gen truncado (*qacEΔ1*), siendo *qacE* quien codifica una proteína exportadora de drogas como compuestos de amonio cuaternario, el gen *sul1* que codifica dihidropterato sintetasa y confiere resistencia a sulfonamidas, y un marco de lectura abierto con función desconocida (*orf5*).

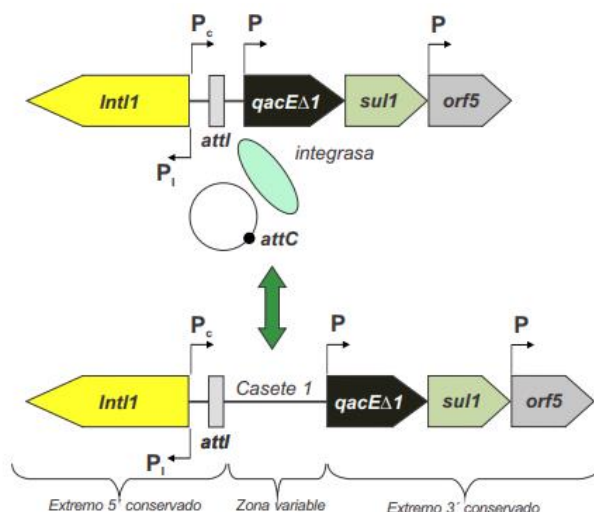


Figura. I.8. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón de clase 1 clásico y de la adquisición o escisión de casetes de genes de resistencia. *intI1*: gen que codifica la integrasa clase 1; *attI1*: sitio de recombinación del integrón en el cual los casetes son integrados; P_i : promotor que transcribe la integrasa; P_c : promotor que dirige la transcripción de los casetes integrados; *attC*: sitio de recombinación del casete; *qacEΔ1*: gen codificante de una proteína exportadora de compuestos de amonio cuaternario, truncado; *sul1*: gen que codifica resistencia a sulfonamidas, y *orf5*: marco de lectura abierto con función desconocida. Figura adaptada (Gonzales-Escalante, 2011).

La integración y escisión de casetes de genes empleando como modelo al integrón de clase 1 clásico se muestra en Fig. I.8. La integrasa es la responsable de catalizar el evento de recombinación entre el sitio *attI1* del integrón y el sitio *attC* (o secuencias 59-be) del casete génico (Mazel, 2006; Di Conza y Gutkind, 2010; Gillings, 2014). Al integrarse un casete de genes, en la región variable, queda situado adyacente al sitio *attI1* y en la misma orientación. Esta

localización es óptima para la expresión del reciente gen entrante (Di Conza y Gutkind, 2010; Gillings, 2014).

I.4.1.2.1. Implicancia clínica de integrones de clase 1 con casetes de genes de resistencia

La elevada y rápida diseminación de integrones de clase 1 entre BGN con casetes de genes de resistencia en el ámbito clínico ha sido facilitado por su asociación a plataformas genéticas móviles, y seleccionados por presión de selección antimicrobiana en la “Era de los antibióticos” (Di Conza y Gutkind, 2010; Gillings, 2017). Esta situación ocasiona serias dificultades para el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por bacterias multirresistentes (Partridge et al., 2009). Así, los eventos que podrían estar involucrados en la diseminación de genes de resistencia incluye inicialmente recombinación de los casetes en integrones (localizados en cromosoma o en plásmidos), seguido de inserción de estos últimos en transposones, posterior transposición de los mismos a plásmidos (conjugativos o movilizables), y finalmente movilización de los plásmidos por conjugación desde una bacteria a otra por THG (Norman et al., 2009). Todos estos eventos, ejemplificados en la figura I.9, resultan seleccionados ante la fuerte presión selectiva antimicrobiana a nivel nosocomial y aportan así una fuerza motriz esencial en la evolución bacteriana (Norman et al., 2009).

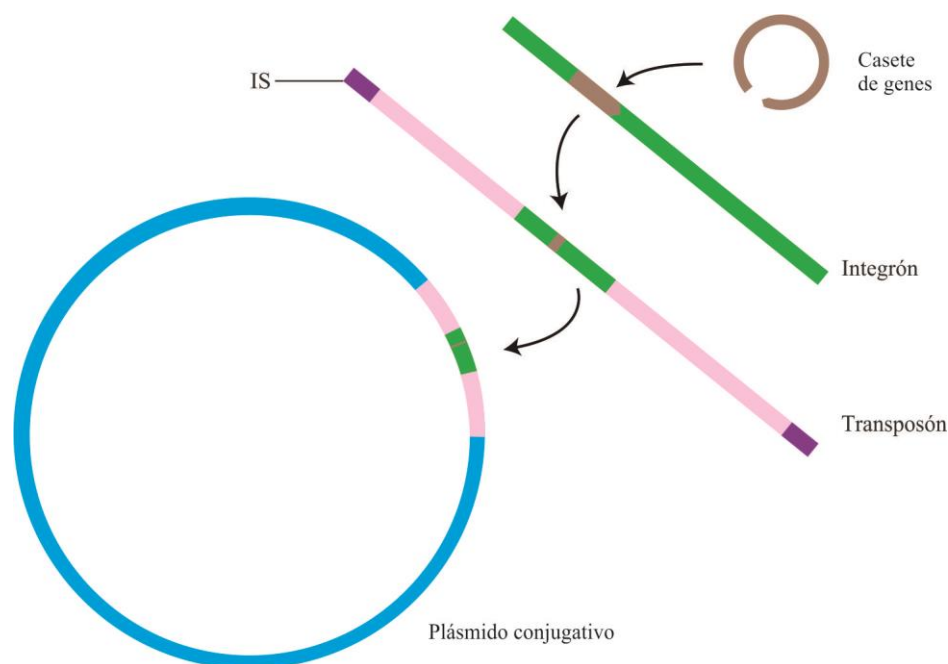


Figura. I.9. Representación de los eventos involucrados en la diseminación de casetes de genes de resistencia. Captura de casetes de genes por integrones, inserción de integrones a transposones, movilización de estos últimos a plásmidos (conjugativos), y finalmente transferencia plasmídica por conjugación desde la bacteria dadora a una aceptora. Figura adaptada (Norman et al., 2009).

Los integrones de clase 1 han sido encontrados frecuentemente en cepas de origen nosocomial, incluyendo bacterias ambientales, así como comensales y patógenas del hombre, seleccionados esencialmente por presión de selección antimicrobiana (Partridge et al., 2009; Di Conza y Gutkind, 2010). Sin embargo, existen numerosos estudios que documentan el hallazgo de integrones de resistencia provenientes de aislamientos recuperados de ambientes naturales (agua, suelo, intestino de animales, entre otros) sin reconocida exposición a antimicrobianos (Stokes et al., 2006; Di Conza y Gutkind, 2010). La detección de integrones de clase 1 en bacterias de ambientes naturales, sin casetes de genes de resistencia, apoya la hipótesis de que estas plataformas genéticas, en bacterias ambientales, actuarían como reservorio de genes en casetes, y participarían asimismo en la diseminación de integrones de resistencia entre BGN de importancia clínica (Stokes et al., 2006).

Numerosas familias de MβLs adquiridas producidas por BGN de importancia clínica se encuentran codificadas en integrones clase 1 (*i.e.* IMP, VIM, GIM, SIM, DIM y TMB), (Walsh et al., 2005; Queenan y Bush, 2007; Patzer et al., 2009; Tato et al., 2010; Cornaglia et al., 2011, El Salabi et al., 2012). Asimismo, algunas variantes de MβLs tipo-IMP se han asociado a integrones de clase 3 (Queenan y Bush, 2007). Sin embargo, los genes codificantes de las MβLs AIM-1, SPM-1, FIM-1 y de las enzimas tipo-NDM no se han asociado a integrones (Cornaglia et al., 2011; Pollini et al., 2013).

La extensa diseminación de los genes tipo-*bla_{VIM}* en BGN es debido a su asociación a integrones de clase 1, los cuales a su vez están insertos en transposones y/o plásmidos (Zhao y Hu, 2011b). Particularmente, *bla_{VIM-2}* es el gen mayormente reportado en integrones de clase 1 y se encuentra usualmente asociado a otros genes de resistencia, mostrando esto un desalentador escenario clínico (Zhao y Hu, 2011b). Entre los distintos BGN portadores de *bla_{VIM-2}*, *P. aeruginosa* es la especie más reportada en clínica humana, responsable de múltiples brotes infecciosos (Zhao y Hu, 2011b; Hong et al., 2015). En este contexto, se ha propuesto que *P. aeruginosa* es el principal reservorio de genes tipo-*bla_{VIM}* (Zhao y Hu, 2011b). Estudios recientes mostraron la presencia de *bla_{VIM-2}* en especies ambientales y clínicas incluyendo *P. putida*, *P. monteilii*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes* (Zhao y Hu, 2011b; Scotta et al., 2011; Marchiaro et al., 2014a), lo que llevó a hipotetizar que microorganismos ambientales del género *Pseudomonas* constituirían un reservorio de genes de resistencia (Koh et al., 2004; Quinteira et al., 2006; Pellegrini et al., 2009). En este contexto, este trabajo de Tesis incluyó miembros de *P. grupo putida* bajo la idea de aportar nuevo conocimiento sobre las estructuras portadoras de

bla_{VIM-2} en diferentes especies de este grupo. Asimismo, las bases moleculares de los mecanismos de diseminación de dichas estructuras entre miembros del género *Pseudomonas*, y más aún desde miembros ambientales (como *P. grupo putida*) a especies patógenas oportunistas (como *P. aeruginosa*) están escasamente caracterizadas al presente.

I.4.1.2.2. Evolución y diversidad de integrones clase 1

Los integrones de clase 1 descritos al presente tendrían su origen en integrones localizados en cromosomas de beta-proteobacterias ambientales (Stokes et al., 2006; Sajjad et al., 2011; Gillings, 2014). En Fig. I.10. se muestra la representación esquemática de la evolución y divergencia de integrones clase 1 propuesta por Gillings y cols (Gillings, 2014). La hipótesis sostiene que integrones de clase 1 localizados en cromosoma de beta-proteobacterias, portadores de *qacE* (Fig. I.10.A) y expuestos a presión de selección a antibióticos (al inicio de la era antimicrobiana) han seleccionado eventos de inserción/recombinación en un transposón funcional que exhibe un módulo *tni* completo (B). Así, se generaron híbridos, *i.e.* integrón/transposón, como es el caso de los transposones tipo-Tn402 (C). Este tipo de elemento genético tiene la capacidad de transponer, y son portadores de un integrón de clase 1 con sus propios casetes de genes de resistencia. Por tanto, la estructura completa de estos elementos incluye *intI1*, el sitio *attI*, una región variable con casetes de genes, y corriente abajo un módulo de transposición completo, que contienen los ya mencionados genes *tniA*, *tniB*, *tniQ* y *tniC* (ítem I.4.1.1), flanqueado por secuencias repetidas e invertidas (IR) de 25 pb, IRI en el extremo izquierdo e IRT en el derecho (C). Se identificó asimismo un sitio *res* o de resolución de multímeros entre los genes *tniC* y *tniQ*, requerido durante la transposición (Radström et al., 1994; Kholodii et al., 1995; Kamali-Moghaddam y Sundstom, 2001). Eventos de inserción posteriores integraron el gen *sull1*, que codifica resistencia a sulfonamidas, así como *orf5*, marco de lectura abierto con función desconocida, deletando además parte del gen *qacE* (D). Subsiguientes eventos que incluyeron deleciones parciales en el módulo *tni* así como ganancia y/o pérdida de casetes dieron origen a los integrones de clase 1 denominados clásicos (E). Así, estos poseen así en el extremo 5' la secuencia conservada antes descrita (5'CS), la región variable con casetes de genes de resistencia, y en el extremo 3' la secuencia conservada (3'CS) que posee *qacEΔ1* fusionado a *sull1* y *orf5*. Corriente arriba del 3'CS suelen presentar sólo restos o vestigios del módulo *tni*, generando integrones incompetentes para la transposición (E). La adquisición de nuevos casetes constituyeron eventos frecuentes, y aquellos integrones con módulo *tni* defectuoso, pero que conservan las IRs han mostrado capacidad de transponer a otros transposones, como los de la

familia Tn3 (e.g. Tn21) o plásmidos, siempre que las funciones de transposición sean provistas en *trans* por otros transposones funcionales co-residentes en la bacteria (F). Todos estos eventos serían responsables de la diversidad de integrones de clase 1, así como de la acelerada diseminación de los mismos entre bacterias patógenas y comensales del hombre, mediada esencialmente por plásmidos y transposones (Gillings, 2014).

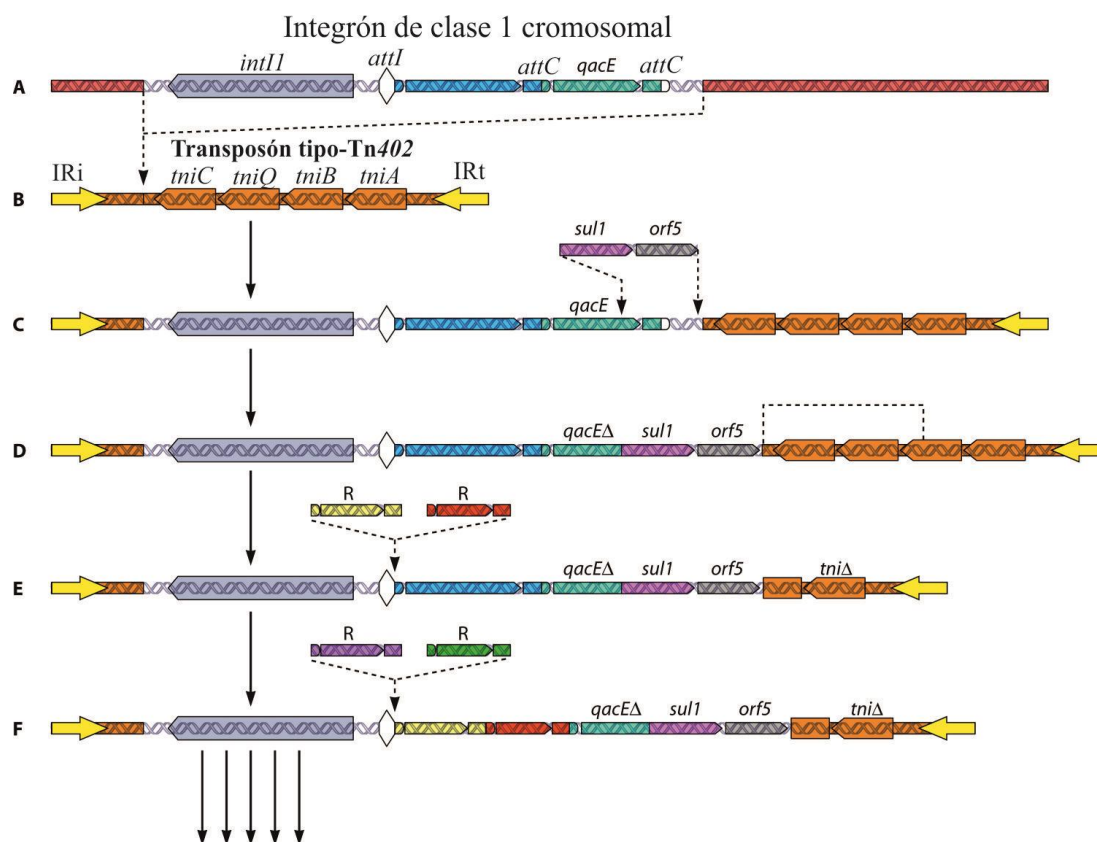


Figura. I.10. Representación esquemática de la evolución y divergencia de integrones clase 1. Los detalles se describen en el texto. Esquema adaptado (Gillings et al, 2014).

I.4.1.2.2.1. Ancestro de integrones de clase 1: transposón Tn402

El análisis de la secuencia del transposón Tn402 o Tn5090 (Shapiro y Sporn, 1977; Radström et al., 1994) indicó su pertenencia a una nueva familia de transposones diferente a los de la familia Tn3. Este elemento posee en el extremo 5' la secuencia conservada 5'CS (i.e. *intI1* y el sitio *attI*), en su porción central una región variable con casetes de genes que incluye *dhfr* (codificante de dihidrofolato-reductasa), un marco abierto de lectura (*orfD*) y *qacE* (cuyo producto confiere resistencia a compuestos de amonio cuaternario), y en su extremo 3' incluye un módulo completo de transposición *tni* (Fig. I.11); denominándose también integrón/transposón Tn402 (Stokes et al., 2006). Aquellos elementos que presentan en su estructura variaciones respecto a la estructura arriba detallada han sido denominados integrones/transposones tipo-Tn402.

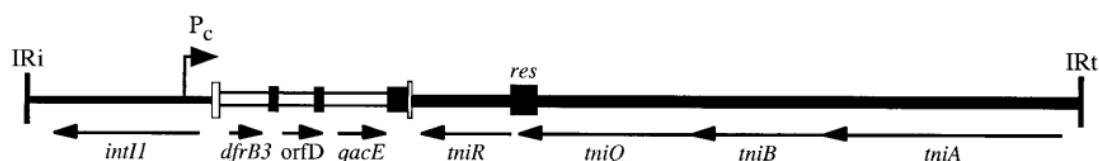


Figura I.11. Representación esquemática del Tn402. Las repeticiones invertidas de 25 pb se indican mediante barras altas (IRi e IRt). Cada casete se muestra como una caja blanca que incluye el gen y una caja negra adyacente que representa el *attC*. Las dos partes de los sitios *attI* que flanquean los casetes se muestran como barras blancas, y se indican las posiciones y direcciones de los promotores *Pc*. Modelo adaptado (Collis et al, 2002).

I.4.1.2.2.2. Integrones de clase 1 inusuales

Integrones de clase 1 caracterizados por presentar el extremo 5'CS característico, casetes de resistencia en la región variable, y un extremo 3' carente del 3'CS clásico han sido descritos menos frecuentemente (Stokes et al., 2006; Post et al., 2007; Toleman et al., 2007; Partridge et al., 2009; Samuelsen et al., 2009; Tato et al., 2010; Faccone et al., 2014; Zhang et al., 2017). Estos integrones han sido denominado inusuales, o integrones derivados del Tn402 por presentar generalmente el módulo *tni* defectivo (Stokes et al., 2006; Post et al., 2007; Toleman et al., 2007; Partridge et al., 2009; Samuelsen et al., 2009; Tato et al., 2010). Ha sido reportado que la deficiencia en los genes del módulo *tni* en estos transposones les impide transponer (Kholodii et al., 1995; Kamali-Moghaddam y Sundstrom, 2001). Sin embargo, si las IRs permanecen intactas sería posible su transposición siempre que la función faltante sea suplementada en *trans* por otro transposón relacionado (Kholodii et al., 1995). Más aún, se han descrito (escasamente) integrones/transposones tipo-Tn402 completos, esto es, con el módulo de transposición intacto en algunas especies asociadas a clínica humana, portadoras de genes codificantes de MβLs en estos elementos genéticos (Toleman et al., 2007; Juan et al., 2010; Marchiaro et al, 2010a; Vilacoba et al., 2014).

Los sitios de inserción reportados para Tn402 (y la mayoría de los transposones tipo-Tn402) corresponden a los sitios *res* o regiones lindantes a los mismos, localizados corriente arriba de genes codificantes de resolvasas (Kholodii et al., 1995; Minakhina et al., 1999; Kamali-Moghaddam y Sunstrom, 2001; Petrovski y Stanisich, 2010). La habilidad de los sistemas de transposición de transposones tipo-Tn402 para emplear sitios *res* como sitio blanco ha conducido a la inserción de integrones de clase 1 dentro de otros transposones o plásmidos que contengan dichos sitios. Esto ha sido determinante para la diseminación de integrones con genes de resistencia ya que al estar asociados a plataformas genéticas móviles, se movilizan por THG,

siendo la conjugación el evento más frecuente (Gillings et al., 2008). La co-asociación de integrones de clase 1 con transposones de la familia Tn3 es la más observada en bacterias recuperadas en la clínica (Stokes et al., 2006; Partridge et al., 2009; Tato et al., 2010; Zhang et al., 2017a).

I.4.1.3. Islas genómicas en BGN

Las islas genómicas (GI) son regiones de ADN localizadas generalmente en los cromosomas bacterianos que contribuyen a la diversificación y adaptación de los microorganismos (Bertelli et al., 2018). Sus características generales incluyen: (i) una composición anormal del contenido de guanina-citosina (GC) respecto al resto del genoma; (ii) la presencia de EGM; (iii) una elevada prevalencia de genes de fagos; (iv) elevada prevalencia de proteínas hipotéticas; y (v) la presencia de repeticiones directas (Bertelli et al., 2018). El contenido genético de las GI han sido usado tradicionalmente para clasificarlas en subtipos de acuerdo al fenotipo que generan: (i) islas de patogenicidad (PAI), que codifican genes involucrados en la patogenicidad/virulencia bacteriana; (ii) islas de resistencia, que codifican genes de resistencia a antimicrobianos; (iii) islas de simbiosis, que poseen genes cuyos productos proteicos permiten la formación de nódulos en plantas; o (iv) islas metabólicas, que codifican genes involucrados en capacidades metabólicas diversas (Bertelli et al., 2018). Sin embargo, actualmente las GI abarcan diferentes elementos incluyendo aquellos que requieren funciones auxiliares para conjugar, como los elementos movilizables integrativos (IME); aquellos que se escinden del cromosoma y se pueden transferir por THG mediados por fagos, como los elementos cromosómicos de casete de estafilococos (SCCmec) y las islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPI); y aquellos con funciones de movilidad, como los elementos conjugativos integrativos (ICE) (Partridge et al., 2018). Las GI han sido detectadas en numerosos BGN incluyendo enterobacterias, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Partridge et al., 2018), siendo particularmente importantes en clones multiresistentes de alto riesgo de *P. aeruginosa*. Las GI se han observado asociadas a integrones/transposones de clase 1 portadores de numerosos genes de resistencia a β -lactámicos incluyendo *bla*_{GES-24}, *bla*_{IMP-6}, o *bla*_{IMP-10} (Partridge et al., 2018). Asimismo, en *A. baumannii* se han sido detectado numerosas GI portadoras de genes involucrados en resistencia a antibióticos y metales pesados, entre otros (Al-Jabri et al., 2018). Aun cuando se han detectado diversas GI en *A. baumannii*, la presencia de estos elementos portadores de genes de resistencia a antibióticos y/o a metales pesados en otras especies del género de *Acinetobacter* es al presente poco documentada.

I.4.2. EGM involucrados en la diseminación de genes entre células

I.4.2.1. Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosomales que pueden ser circulares o lineales. Estos elementos son los principales vehículos de comunicación de información genética, facilitando la adaptación y rápida evolución de los procariotas a diferentes nichos ambientales (Frost et al., 2005; Norman et al., 2009; Shintani et al., 2015). Están presentes en todo tipo de bacterias y puede existir más de un tipo de plásmido dentro de una célula bacteriana, o bien muchas copias de un mismo plásmido. En cuanto a su tamaño, éste puede ser muy variable, rondando entre 0,1 kpb a 100 kpb (Shintani et al., 2015).

La conjugación mediada por plásmidos es el principal mecanismo de THG contribuyendo en la transferencia de genes accesorios, que otorgan al hospedador ventajas selectivas para su adaptabilidad a ambientes diversos, y potencialmente a otros hospederos (Frost et al., 2005; Suzuki et al., 2010). De esta manera, es reconocida la existencia de un “pool” de genes disponibles en las comunidades procariotas, que es movilizado por plásmidos (y otros elementos genéticos móviles), cumpliendo los mismos un rol central en la función y evolución de estas comunidades (Norman et al., 2009). Entre ellos, los plásmidos conjugativos han sido ampliamente caracterizados debido a su asociación a genes de resistencia a antimicrobianos, al poco tiempo de entrar en la era antimicrobiana (Norman et al., 2009). Al presente, se sostiene que bacterias patógenas multirresistentes adquieren los genes de resistencia por THG desde bacterias ambientales (que actúan como reservorios de los mismos), más que por mutaciones durante el tratamiento antimicrobiano (Garcillán-Barcia et al., 2011). La profusa caracterización de los plásmidos de microorganismos que constituyen probables reservorios ambientales (*e.g.* *Pseudomonas* grupo *putida* y *Acinetobacter bereziniae*, entre otros), es relevante para desenmascarar las bases moleculares que explicitan tanto la emergencia y evolución de la resistencia a los antimicrobianos como así también la adaptación bacteriana al nicho nosocomial.

I.4.2.1.1. Estructura funcional de los plásmidos

Estudios recientes sugieren que los plásmidos presentan una estructura modular, siendo los genes codificantes de funciones relacionadas agrupados en segmentos específicos de la molécula de ADN (Norman et al., 2009; Garcillán-Barcia et al., 2011). Se propuso que los distintos módulos presentes en plásmidos provienen de orígenes filogenéticos diversos y que los plásmidos se construyen mediante la yuxtaposición aleatoria de diferentes módulos funcionales

(Osborn y Boltner, 2002; Toussaint y Merlin, 2002; Garcillán-Barcia et al., 2011). Así, la secuencia de un plásmido puede aportar información valiosa del origen de cada módulo, reflejando características de diferentes hospederos y por tanto, aspectos evolutivos del mismo (Norman et al., 2009). Los módulos propuestos son: (i) de replicación el cual involucra genes codificantes de proteínas necesarias para la replicación así como para el control de la misma y un origen de replicación vegetativo (*oriV*); (ii) de estabilidad, el cual incluye genes necesarios para el mantenimiento del plásmido luego de la división celular; (iii) de transferencia, que incluye genes para la maquinaria de conjugación así como el sitio de origen de la transferencia (*oriT*); y (iv) de adaptación, que se circunscribe a genes que confieren rasgos fenotípicos favorables para la supervivencia bacteriana ante presión selectiva, como genes de virulencia y/o de resistencia a los antimicrobianos.

El módulo de replicación de un plásmido define la capacidad del mismo de replicar en diferentes hospederos, es decir determina el rango de hospedador de un plásmido (Norman et al., 2009). Aunque los plásmidos son capaces de controlar de forma autónoma la frecuencia de inicio de la replicación, dependen, en mayor o menor medida, de la maquinaria de replicación del hospedador, tanto para el ensamblaje del replisoma como para las siguientes etapas de elongación y terminación (Snyder y Champness, 2007). Esto implica la existencia de una comunicación adecuada entre los factores específicos del plásmido y los del hospedador. Es así que la clasificación de los plásmidos según su capacidad de replicación los agrupa, por un lado, en los de estrecho rango de hospedador, y por otro lado, en los de amplio rango de hospedador (Snyder y Champness, 2007; Norman et al., 2009). Además, en algunos tipos de plásmidos este módulo incluye una región que consiste en una serie de secuencias cortas, de entre 17 y 22 nt, repetidas en tándem conocidas como “iterones” (Konieczny et al., 2014). Estas secuencias forman parte del *ori*, y juegan un rol crucial en el inicio de la replicación y en el control del número de copias (Konieczny et al., 2014).

Por otro lado, el módulo de estabilidad contiene los genes involucrados en funciones de mantenimiento de los plásmidos. De esta manera, los plásmidos consiguen mantenerse estables en los linajes bacterianos por medio de tres mecanismos, ninguno de ellos universal: mecanismos de resolución de multímeros, sistemas de partición o segregación y sistemas de adición molecular (o toxina/antitoxina; TA) (Hayes, 2003; Garcillán-Barcia et al., 2011). Los mecanismos de resolución de multímeros se encuentran en algunos tipos de plásmidos para poder resolver el producto de la replicación de manera adecuada. También son necesarios para la

resolución de los multímeros que aparecen por causa de la recombinación entre las copias del plásmido. Muchos plásmidos multicopia contienen únicamente un sitio llamado *cer*, en el que una resolvasa de la célula huésped actúa, convirtiendo el multímero en monómero (Hodgman et al., 1998; Garcillán-Barcia et al., 2011; Midonet y Barre, 2014). La ausencia de este sistema hace que aparezcan multímeros de orden cada vez mayor, que son más inestables, con lo que eventualmente se perderán. Esta teoría ha sido denominada “catástrofe dimérica” (Summers et al., 1993; Garcillán-Barcia et al., 2011; Midonet y Barre, 2014). Los sistemas de partición se organizan generalmente en un único *loci*, denominado *par*, que consta de tres elementos, *parA*, codificante de una NTPasa, *parB*, cuyo producto proteico interactúa con el ADN, y *parC*, codificante del centrómero del plásmido. Los sistemas más comunes de partición se clasifican en tres tipos, diferenciados por la clase de ATPasa de que disponen (Gerdes et al., 2011). Por último, los sistemas TA tienen por finalidad eliminar la potencial competencia ecológica de las poblaciones bacterianas que han perdido el plásmido en cuestión. Esta eliminación pasa por utilizar un sistema dual, compuesto de una molécula estable, que detiene el crecimiento celular o, directamente, elimina la célula. El segundo compuesto sería una molécula inestable, que contrarresta la acción de la primera, pero que necesita de la secuencia codificante para mantener una cantidad suficiente en el citoplasma celular. Cuando una célula hija ha perdido el plásmido presente en la célula parental, aun recibe el complejo toxina-antitoxina. La antitoxina se irá degradando y desapareciendo de la célula hija, dejando libre a la toxina para que actúe (Garcillán-Barcia et al., 2011). Los sistemas TA se clasifican actualmente en seis grupos designados como tipo I-VI siendo el tipo II el más estudiado. Los sistemas de tipo II son los más abundantes entre los plásmidos y consisten en una antitoxina (proteína) que forma un complejo estable con la toxina bloqueando su sitio activo (Chan et al., 2016). Sin embargo, la antitoxina es continuamente degradada por la acción de las proteasas de la célula huésped, de manera que es continuamente repuesta. La pérdida del plásmido durante la división celular implica que no va a poder proveer más antitoxina, con lo que la toxina queda libre para actuar sobre su(s) diana(s). Esto explicaría la organización de la mayoría de los operones TA de tipo II: el gen de antitoxina precede al gen de la toxina, los cuales son transcritos bajo el mismo promotor, permitiendo así que la antitoxina se produzca antes de que comience la síntesis de la toxina (Chan et al., 2016).

El módulo de adaptabilidad es el más variable y exhibe mayor cantidad de cambios, si se compara con las modificaciones ocurridas en las otras estructuras modulares plasmídicas. Este módulo está conformado por genes que confieren rasgos fenotípicos favorables para la

supervivencia bacteriana ante presión selectiva, como genes de virulencia y/o de resistencia a los antimicrobianos. Sin embargo, la replicación de este módulo conlleva un gasto energético extra, por lo cual su manutención demanda de presión selectiva continua o de su asociación al módulo de estabilidad (Garcillán-Barcia et al., 2011). En este módulo se incluyen todos los elementos genéticos (EG) mencionados anteriormente: IS, transposones, integrones y GI.

Por último, el módulo de transferencia contiene los genes que permiten la movilización de los plásmidos. La habilidad de los plásmidos de desplazarse entre bacterias, permite agruparlos en plásmidos transferibles conjugativos o movilizables (Smillie et al., 2010). Los conjugativos contienen toda la maquinaria de genes que les permite ejecutar el complejo proceso de conjugación entre bacterias, y se denominan autotransferibles. Por su parte, los movilizables codifican solo una parte de los genes requeridos para la transferencia, por lo cual necesitan que las funciones que les faltan sean provistas en *trans* por el cromosoma o por un plásmido conjugativo (coexistente).

I.4.2.1.1.1. Implicancia de los sitios XerC/D en la formación de módulos transferibles

La mayoría de las especies bacterianas, si no todas, con cromosomas circulares, utilizan la recombinación sitio-específica para resolver los dímeros cromosómicos formados durante el proceso de replicación (Colloms, 2013). En algunos BGN como *E. coli* y en particular en BNF como *A. baumannii*, los dímeros cromosómicos se resuelven en monómeros mediante la acción de las tirosín recombinasas XerC y XerD que actúan coordinadamente para catalizar la adición de un evento de recombinación sitio-específica entre un par de sitios denominados “*dif*” (análogos a los sitios *cer*). Asimismo, numerosos autores han reportado el empleo del sistema XerC/D para la resolución de estructuras multiméricas en plásmidos, formadas durante su replicación, en los sitios *cer* previniendo la denominada “catástrofe dimérica” (Garcillán-Barcia et al., 2011; Colloms, 2013; Midonet y Barre, 2014) mencionada anteriormente. De hecho, XerC se descubrió inicialmente debido a su implicancia en la estabilidad del plásmido ColE1 de *Escherichia coli*. El sitio XerC/XerD (cromosómico o plasmídico) consiste en dos regiones de unión de 11 pb denominadas XerC y XerD para el reconocimiento de las tirosín recombinasas respectivas, separadas por una región de central (rc) de 6 pb, en los bordes de la cual ocurre el intercambio de las hebras de ADN durante el proceso de recombinación (Fig. I.12). Además de su papel en la resolución de multímeros, el sistema de recombinación XerC/D está involucrado en los procesos de integración y escisión de elementos de ADN exógenos, en particular, algunos fagos, como resultado de la recombinación específica de los sitios entre *dif* de los cromosomas y de los fagos

(Das et al., 2013). Es de destacar que numerosos reportes revelaron la participación de este sistema en la movilización de módulos de ADN intracelularmente dentro de plásmidos principalmente en BNF como *A. baumannii*. En este sentido, se han observado plásmidos conteniendo estructuras portadoras de *bla_{OXA}* bordeadas por secuencias cortas de 27-28 nt que muestran homología con sitios XerC/XerD, lo que ha llevado a proponer que su movilización podría estar mediada por eventos de recombinación sitio-específica mediados por el sistema XerC/D del hospedador (Poirel y Nordmann, 2006; D'Andrea et al., 2009; Merino et al., 2010; Evans y Amyes, 2014; Blackwell y Hall, 2017; Cameranesi et al., 2018). Por último, este sistema también ha sido reportado como el responsable de la movilización de genes no codificantes de genes de resistencia a antibióticos, como por ejemplo genes codificantes de proteínas involucradas en la resistencia a cromo (Mindlin et al., 2018) y genes del sistema toxina-antitoxina (Blackwell y Hall, 2017). Sin embargo, la presencia de sitios XerC/D en plásmidos de especies de BNF escasamente reportadas en la clínica (como *A. bereziniae*) no ha sido evaluado y es objeto de estudio en este trabajo. Así, el aporte de este sistema en la conformación de estructuras plasmídicas quiméricas que otorguen ventajas selectivas para la sobrevivencia de la bacteria en nichos ambientales como clínicos podrá revelar el rol de estos sistemas en el ensamble y movilización de regiones flanqueadas por dichos sitios, o formación de cointegrados, aportando así a la evolución del plasmidoma de *Acinetobacter*.



Figura I.12. Secuencia XerC/D consenso derivada del análisis de estos sitios en plásmidos de cepas locales de *A. baumannii*. El sitio de reconocimiento de la recombinasa XerC (XerC) está constituido por los primeros 11 nucleótidos en el sentido 5'-3' (subrayado en azul). La región central (rc) está constituida por 6 pb (subrayada en rojo), y la región donde se une la recombinasa XerD (XerD) está formada por los últimos 11 pb (subrayado en verde). Las letras mayúsculas y minúsculas indican nt conservados y no conservados, respectivamente. Figura adaptada (Cameranesi et al, 2018).

I.4.2.1.2. Plásmidos conjugativos y movilizables

El módulo de transferencia posee 2 regiones denominadas “Dtr” (por “DNA-transfer replication”) o región de transferencia del ADN; y “Mpf” (por “mating pair formación”) o formación del par conjugativo, respectivamente (Garcillán-Barcia et al., 2011). La región Dtr ha sido denominada asimismo como región “MOB” (por “Mobility”); e incluye el origen de transferencia (sitio *oriT*), el gen *virD2*, codificante de una relaxasa (endonucleasa que corta una hebra del ADN plasmídico en el sitio *oriT* propiciando luego su unión covalente, formando el relaxosoma), y el gen codificante de una ATPasa o proteína de acoplamiento del relaxosoma,

llamada “coupling protein” (CP) perteneciente al sistema de secreción tipo IV (SST4). Por su parte, la región Mpf incluye otro grupo de genes, organizados en un operón, pertenecientes al SST4, responsable de la síntesis del canal, así como de la síntesis de un filamento (ó pili conjugativo), estructuras necesarias para el transporte del relaxosoma a la célula aceptora. El SST4 más conocido es el sistema de transferencia de ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, denominado sistema *virB* y que sirve como modelo (Guglielmini et al., 2012). Se trata de un macro-complejo multiproteico, que abarca la membrana interna, el espacio intermembrana, la membrana externa bacteriana y se proyecta hacia el exterior celular (Fig. I.13). El complejo central del SST4, el primero en ensamblarse, se encuentra en el espacio intermembranas y se incluye en las membranas interna y externa. Las proteínas VirB7, VirB9 y VirB10 son sus componentes y juntas forman el canal de secreción del SST4 (Fig. I.13). VirB10 forma la cara interna de este canal, así como el anillo inferior (membrana interna) del complejo. Además, abarca la longitud completa del complejo. VirB9 forma el recubrimiento exterior del complejo, el cual es estabilizado por la acción de VirB7, una lipoproteína (Guglielmini et al., 2012). VirB3, VirB6 y VirB8 se unen a este complejo por la parte de la membrana interna, donde forman un poro (Fig. I.13; Guglielmini et al., 2012). VirB6 es una proteína con dominios transmembrana y un lazo periplásmico grande. VirB3 no tiene un papel claro, aunque parece que es esencial para la formación del pilus. En algunos sistemas aparece fusionada a VirB4, sugiriendo una fuerte relación entre el papel funcional de ambas (Guglielmini et al., 2012). Al complejo así ensamblado se unen tres ATPasas, VirB4, VirB11 y la CP (o VirD4), de las que VirB4 se encarga de proporcionar energía a la síntesis del pilus, formado por las pilinas mayor (VirB2) y menor (VirB5) (Fig. I.13; Guglielmini et al., 2012). Por último, VirB1 es una transglicosilasa no esencial, que degrada el peptidoglicano de la pared bacteriana, facilitando el ensamblaje del SST4 (Fig. I.13; Guglielmini et al., 2012).

La clasificación de los plásmidos, basada en la capacidad de transferencia, define como movilizable a aquel que posee en su secuencia a la región Dtr (*i.e.* sitio *oriT*, gen codificante de la relaxasa y de la CP), pero carece de la región Mpf (Smillie et al., 2010). Este último tipo de plásmidos no puede auto-transferirse por conjugación. Sin embargo, si en una bacteria coexiste un plásmido movilizable con otro conjugativo, es posible que el primero se transfiera por conjugación si las funciones de la región Mpf son aportadas en *trans* por el segundo plásmido (Smillie et al., 2010). Asimismo, es interesante destacar que se han descrito plásmidos movilizables conteniendo en la región Dtr el sitio *oriT* y el gen codificante de la relaxasa, pero carentes de la CP (Smillie et al., 2010). Por lo tanto, la única proteína de la maquinaria de

transferencia que tienen en común los plásmidos transferibles (conjugativos y movilizables) es la relaxasa (Francia et al., 2004, Smillie et al., 2010). Así, algunos autores han propuesto que la secuencia aminoacídica de la misma constituye una herramienta filogenética de utilidad para la clasificación de plásmidos transferibles (Francia et al., 2004).

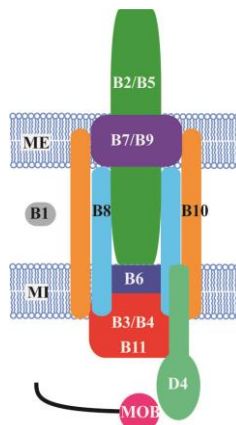


Figura. I.13. Modelo esquemático del SST4 de *Agrobacterium tumefaciens*. B1 a B11: representa proteínas VirB1 a VirB11; MOB: relaxasa (VirD2); D4: VirD4 (CP, “coupling protein”); P: periplasma; C: citoplasma. Para detalles, ver texto. Figura adaptada (Guglielmini et al, 2012).

I.4.2.1.3. Clasificación de los plásmidos

Numerosas razones han motivado el desarrollo de diferentes sistemas de identificación y clasificación de plásmidos. Entre ellas, conocer su distribución en la naturaleza y asociación a hospederos particulares; evaluar su participación en la diseminación de genes de virulencia, metabólicos, y de resistencia entre bacterias, ambientales, comensales y/o patógenas para el hombre (Francia et al., 2004; Garcillán-Barcia et al., 2011); así como para desenmascarar sus relaciones genéticas y el origen evolutivo de los mismos. La clasificación de los plásmidos permite así abordar la dinámica y el mecanismo de su propagación en la naturaleza, lo cual brindará herramientas para controlar, y/o limitar la diseminación de los genes de resistencia (Garcillán-Barcia et al., 2011).

Han sido descriptos diferentes sistemas de clasificación de los plásmidos. Dado que es posible encontrar varios plásmidos en una célula, surgió inicialmente una clasificación basada en grupos de incompatibilidad o grupos Inc (Carattoli et al., 2005). Se basa en incluir en un mismo grupo a aquellos plásmidos relacionados que no son capaces de mantenerse ni de ser heredados de forma estable en la misma línea celular, debido a que comparten los mecanismos de replicación y control. En la actualidad, este análisis de incompatibilidad ha quedado obsoleto fundamentalmente debido a que resulta laborioso experimentalmente (Garcillán-Barcia et al., 2011) y se propusieron otros sistemas como la tipificación de replicones basada en PCR (PBRT).

Este método muestra como principales limitaciones la necesidad de diseñar cebadores para los distintos grupos de bacterias; la presencia de más de un sistema de replicación ó más de un origen de replicación en algunos plásmidos; la rápida evolución y diversidad en las secuencias blanco; así como a la existencia de regiones híbridas de replicación (Garcillán-Barcia et al., 2009). Luego, clasificaciones basadas en la secuenciación de 2 a 5 genes (pMLST) han sido propuestas (Partridge, 2018). Todos estos sistemas han sido utilizados principalmente para los plásmidos hallados en enterobacterias y en algunos casos para BNF como *P. aeruginosa* (Partridge, 2018). Particularmente para *Pseudomonas* spp., la mayoría de los plásmidos recuperados de este grupo bacteriano no son transferibles a *E. coli* y por lo tanto se clasificaron en otros grupos de incompatibilidad (IncP-1 a IncP-13). Estos grupos Inc han sido encontrados en varias especies de *Pseudomonas* y son comunes en especies del género recuperadas del medio ambiente, aunque no presentan usualmente genes de resistencia (Partridge, 2018). En este contexto, es de destacar que la secuenciación completa constituye otro método de caracterización de plásmidos (Partridge, 2018). Sin embargo, son escasos los plásmidos portadores de genes de resistencia caracterizados en base a su secuenciación completa, siendo al presente secuenciados mayoritariamente solo aquellos correspondientes a *P. aeruginosa*, por lo que la variabilidad y tipo de plásmidos no ha sido estudiada globalmente en este importante género bacteriano. *Acinetobacter* spp. es otro de los grupos bacterianos de los cuales hay escasa información sobre la diversidad plasmídica y un sistema basado en PBRT (AB-PBRT) ha sido propuesto para *A. baumannii* (Partridge, 2018). La importancia del estudio de los plásmidos en esta bacteria radica en el amplio y diverso arsenal de genes de resistencia localizados especialmente en estos EGM (Wright et al., 2014). El análisis de las secuencias de las replicasas correspondientes a cepas de *A. baumannii* mostró variabilidad respecto a las de otras especies bacterianas, sugiriendo fuertemente que *A. baumannii* contiene sus propios tipos de plásmidos. Esto condujo a un esquema de clasificación (AB-PBRT) basado en comparaciones de los genes y proteínas de las replicasas, pertenecientes principalmente a la superfamilia Rep-3, para categorizar los plásmidos de *A. baumannii* en grupos de homología (GR) (Bertini et al., 2010; Lean y Yeo, 2017; Cameranesi et al., 2018). Con el advenimiento de los nuevos métodos de secuenciación sumado a la correcta asignación bacteriana, se empezaron a hallar diversos plásmidos portadores de genes de resistencia pertenecientes a especies de *Acinetobacter* spp. distintas a *A. baumannii* (Zhao y Hu et al., 2012; Hu et al., 2012; Jones et al., 2015). Este escenario llevó a proponer un nuevo sistema de clasificación de las Rep que incluya a todas aquellas proteínas contenidas en plásmidos del género *Acinetobacter* (Salto et al., 2018). Así, el nuevo esquema propone clasificar las Rep en grupos de homología o AR3G (por

“*Acinetobacter* Rep-3 Groups”), dado que la gran mayoría de los plásmidos recuperados de este género presentan el dominio de la superfamilia Rep-3 (Salto et al., 2018). Los grupos al presente descritos son 16, y se adoptó como punto de corte 60% de identidad aminoacídica (Salto et al., 2018).

Otro sistema de clasificación de plásmidos se basa en la comparación de las secuencias de las relaxasas (proteínas iniciadoras de la transferencia plasmídica) codificadas en la región Dtr (o MOB). Así, esta clasificación de plásmidos (según región de movilidad) se la denominó sistema de clasificación MOB (Francia et al., 2004; Garcillán-Barcia et al., 2009). La relaxasa contienen dos o más dominios funcionales y, normalmente, tanto la actividad endonucleasa como el dominio de unión a DNA se localizan en la región N-terminal (dominio relaxasa), mientras que la región C-terminal podría contener dominios con actividad helicasa o primasa, además de dominios de oligomerización e interacción con otras proteínas (Francia et al., 2004; Garcillán-Barcia et al., 2009). El sistema de clasificación MOB empleó el alineamiento y el análisis filogenético de secuencias correspondientes a los 300 aminoácidos del extremo N-terminal de las relaxasas (dominio relaxasa) para la clasificación de plásmidos movilizables (Francia et al., 2004) y conjugativos (Garcillán-Barcia et al., 2009). Las relaciones filogenéticas entre las relaxasas han conducido a clasificar a los plásmidos en 6 familias MOB distintas, incluyendo MOB_F, MOB_{HEN}, MOB_C, MOB_Q, MOB_P y MOB_V, y éstas a su vez en clados y subclados (Francia et al., 2004; Garcillán-Barcia et al., 2009). Recientemente, ha sido reportado un nuevo subclado MOB_{QAc} específicamente compuesto por relaxasas de miembros de *Acinetobacter* spp. (Salto et al., 2018). El resultado del análisis filogenético empleando las secuencias aminoacídicas de las proteínas de acopamiento (CP, ítem I.4.2.1.2) resultó congruente con los resultados de sus respectivas relaxasas, sugiriendo que ambas proteínas de un plásmido comparten un mismo camino evolutivo (Garcillán-Barcia et al., 2009). Relaxasas similares comparten el mismo mecanismo de procesamiento del ADN en la conjugación, por lo que el tipo MOB al cual fue asignado un plásmido según el análisis filogenético de su relaxasa sería un adecuado descriptor del sistema de transferencia de un plásmido (Garcillán-Barcia et al., 2009). Este sistema de clasificación de los plásmidos tiene ventajas significativas, que incluye la presencia en base de datos de numerosas secuencias pertenecientes a bacterias de diferentes filos principalmente *Proteobacterias*, la existencia de una sola relaxasa en la mayoría de los plásmidos, así como el empleo de ensayos de PCR con cebadores diseñados para tal fin, simplificando su uso (Garcillán-Barcia et al., 2009). La principal limitación es la imposibilidad de clasificar aquellos plásmidos que no son movilizables.

Aun cuando existen distintos sistemas para clasificar los plásmidos, numerosos plásmidos no puede ser incluidos debido a la carencia de replicasas, como el caso del plásmido ColE1 (Lean y Yeo, 2017), y/o de relaxasas, como el caso de los plásmidos no movilizables. En estos casos, el análisis completo de la secuencia del plásmido sería el mejor criterio de clasificación. Sin embargo, es una metodología costosa y de difícil aplicación (Garcillán-Barcia et al. 2011; Suzuki et al., 2010).

Así, en los modelos de estudios seleccionados para este Trabajo de Tesis se intentará aportar datos útiles sobre la importancia de los plásmidos en la diseminación de MβLs en especies de BNF escasamente reportados en la clínica. Por un lado, se evidenciará la presencia de plásmidos portadores de *bla_{VIM-2}* en cepas clínico/ambientales de especies de *P. grupo putida* como así también en cepas clínicas de *P. aeruginosa* y por otro lado, se mostrará la variabilidad de plásmidos albergados en una cepa clínico/ambiental como *A. bereziniae* productor de NDM-1. De esta manera, se aportarán evidencias sobre el rol de bacterias que sobreviven en nichos variados (clínico como ambiental) como reservorio de genes de resistencia de importancia clínica.

I.5. Rol de los ambientes naturales en la evolución de la resistencia de bacterias patógenas

Los antimicrobianos se encuentran entre los compuestos más valiosos utilizados desde hace más de 60 años para combatir infecciones humanas y reducir la morbi-mortalidad asociada. Desafortunadamente, las bacterias patógenas del ser humano han evolucionado hacia la resistencia a tales compuestos (Martínez, 2009). Debido a esto, la emergencia de nuevos genes de resistencia, así como las plataformas genéticas portadoras de dichos genes, que facilitan su captura, transferencia y expresión, son sujeto de una intensa investigación (Cantón, 2009).

El origen de los genes de resistencia a antimicrobianos ha sido motivo de diversas conjeturas. En términos generales, es reconocido que los antimicrobianos así como sus genes de resistencia se han generado, y evolucionado, en contextos no-clínicos (*i.e.* naturales) antes del uso de antibióticos por el hombre (Martínez, 2009). Es así que se estima, por ejemplo, que las β-lactamasas surgieron hace 2 billones de años (Wright, 2007). Estudios recientes que caracterizaron una colección de bacterias del suelo mostraron que las mismas expresaban resistencia a 7 u 8 antibióticos, entre los cuales se encontraban viejos y nuevos antibióticos, incluyendo naturales, semisintéticos y sintéticos, y aún sin similitud con compuestos encontrados en la naturaleza (Wright, 2007). Estos resultados sugirieron la pre-existencia en la naturaleza de mecanismos de resistencia bacteriana capaces de resistir aún a nuevos antimicrobianos (Wright, 2007). Asimismo, estudios de metagenómica identificaron genes homólogos a genes de

resistencia conocidos, en una gran diversidad de entornos ambientales (Wright, 2007; Cantón, 2009). Aun así, el rol que cumplen los elementos de resistencia en los microorganismos ambientales es objeto de debate (Martínez, 2009). Las comunidades microbianas son altamente competitivas frente a los sustratos del nicho que habitan, incluyendo a los compuestos con actividad antimicrobiana (Wright, 2007; Cantón, 2009). Así, la función esencial de los genes de resistencia sería la de proveer una línea de defensa contra estos compuestos, asegurando la subsistencia. Otra de las funciones de estos genes de resistencia, en ambientes con baja concentración de antimicrobianos, sería la de cumplir funciones metabólicas o de señalización celular (Martínez, 2009). Así, al conjunto de todos los genes de resistencia a antimicrobianos existentes en la naturaleza, incluyendo los de bacterias patógenas y no-patógenas, se lo denominó "resistoma" (Wright, 2007). Asimismo, el resistoma incluye genes precursores de genes de resistencia (*i.e.* con una débil actividad antimicrobiana), pero que bajo presión de selección antibiótica evolucionan en genes de resistencia.

El concepto de reservorio de genes de resistencia deriva del término de resistoma (Cantón, 2009). En este sentido, es de destacar el papel predominante de las actividades humanas en la generación de reservorios ambientales de resistencia a antibióticos como consecuencia del uso de agentes antimicrobianos (Davies J. y Davies D., 2010). Entre ellos, se incluyen el ambiente hospitalario, las plantas de tratamiento de aguas residuales, agua de lagunas, lagos o ríos contaminados por pesticidas empleados en la agricultura o por efluentes provenientes de granjas o frigoríficos con animales tratados con antimicrobianos, o por desinfectantes de uso doméstico, entre otros (Davies J. y Davies D., 2010).

Bajo la hipótesis de que los antimicrobianos son sintetizados por bacterias ambientales, el origen de los genes de resistencia a los mismos, recaería fundamentalmente sobre dichas bacterias (no patógenas del hombre). La emergencia de la resistencia en bacterias patógenas estaría dada así por la capacidad potencial de los genes de resistencia de movilizarse entre bacterias (Wright, 2007; Martínez, 2009; Davies J. y Davies D., 2010). Los mecanismos que favorecen el intercambio de información genética entre bacterias incluyen transformación, traducción y conjugación; mientras que dentro de la célula la movilización de genes ocurre mediante transposición, e incluye elementos genéticos como transposones; IS e ISCR y sitios XerC/D (Wright, 2007; Martínez, 2009; Davies J. y Davies D., 2010; Cameranesi et al., 2018). Asimismo, los integrones como elementos encargados de capturar casetes de genes de resistencia, colaboran en la diseminación de dichos genes cuando son movilizados entre bacterias (Wright, 2007; Davies J. y Davies D., 2010). La notable capacidad de las bacterias para movilizar los

genes y la presión selectiva proporcionada por antibióticos, facilitarían la diseminación de los genes de resistencia entre poblaciones microbianas. Como resultado, el resistoma se expande, y lo hace aún en ausencia de continua selección (Wright, 2007).

Particularmente, los genes codificantes de MβLs transferibles han sido recuperados casi exclusivamente de BGN recuperados de muestras hospitalarias (Scotta et al., 2011). Aun así, se desconocen los orígenes de los genes codificantes de las MβLs adquiridas (Cornaglia et al., 2011). Las fuentes más probables incluyen a bacterias del medio ambiente (Cornaglia et al., 2011; Scotta et al., 2011). Así, estas bacterias pudieron haber transferido estos determinantes de resistencia a BGN (*i.e.* enterobacterias y bacilos no fermentadores), al compartir algún nicho ambiental. De esta manera, en el ámbito clínico, las cepas de BGN que adquirieron los genes para MβLs fueron seleccionados por la exposición a los agentes antimicrobianos dentro de los entornos relacionados a la salud, y constituir reservorios de MβLs (Cornaglia et al., 2011). Al presente, el rol de ambientes no clínicos como reservorios de BGN que hayan adquirido MβLs ha sido escasamente estudiado (Quinteira et al., 2006; Scotta et al., 2011). Algunos autores han hipotetizado que microorganismos ambientales como *Pseudomonas* spp. (*i.e.* *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens* y *P. pseudoalcaligenes*) constituirían un reservorio de genes de MβLs (y de otros genes de resistencia) en ambientes clínicos (*e.g.* aguas residuales, Koh et al., 2004; Quinteira et al., 2006; Pellegrini et al., 2009; Scotta et al., 2011). Asimismo, ha sido propuesto el rol de especies de *Acinetobacter* como reservorio de β-lactamasas (Zhao y Hu, 2012). Esta hipótesis está basada en la extensa detección de estas enzimas en cepas clínicas de *A. baumannii*, así como en otras diferentes especies del género (Poirel et al., 2012; Zhao y Hu, 2012; Dortet et al., 2014). Las estructuras móviles portadoras de genes de resistencia, capaces de movilizarse entre diferentes grupos bacterianos es aún materia de estudio.

La trayectoria evolutiva de los genes de resistencia desde bacterias ambientales a bacterias patógenas dependería de varios factores, que incluyen, i) la transferencia y el establecimiento de dichos genes de resistencia en bacterias patógenas del hombre, y ii) a la presión de selección a la que están expuestas las bacterias patógenas durante el tratamiento antimicrobiano (Martínez, 2009). Así, la adquisición de genes de resistencia es considerado un evento reciente en la evolución de los patógenos humanos, impulsado por la presión de selección ambiental (Martínez, 2009). Aun así, restan esfuerzos para comprender la interrelación de los genes de resistencia y las plataformas genéticas portadoras de los mismos, entre los microorganismos ambientales, comensales y patógenos. Este conocimiento proveerá herramientas para la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas provocadas por bacterias multirresistentes.

I.6. Objetivos de esta Tesis Doctoral

I.6.1. Objetivos Generales

Se analizará la contribución de los eventos de THG en la emergencia y diseminación de genes codificantes de MβLs en BNF oportunistas nosocomiales de nuestra región, con énfasis en *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. Podrán así predecirse aspectos de la evolución de la resistencia en patógenos bacterianos, bajo el objetivo final de aportar información relevante sobre el rol de bacterias clínico-ambientales en la formación de plataformas portadoras de genes de relevancia clínica.

I.6.2. Objetivos Específicos

I.6.2.1. Microorganismos ambientales como *P. putida* constituirían un reservorio de genes de MβLs (Almuzara et al., 2007; Carvalho-Assef et al., 2010; Juan et al., 2010; Santos et al., 2010). No obstante, al presente existen escasos datos experimentales que provean evidencias de los eventos de adquisición de estos genes de resistencia en *P. grupo putida*, y otras especies relacionadas filogenéticamente, y su posterior transferencia (Santos et al., 2010). Es relevante destacar que VIM-2 es la MβL prevalente en nuestro país y la segunda en el mundo, y es posible que EGM como plásmidos constituyan la base racional de la elevada diseminación de este gen de resistencia entre BGN de relevancia clínica como *P. aeruginosa* y enterobacterias. En este contexto, nos planteamos evaluar la contribución de los eventos de transferencia horizontal de genes en la emergencia y diseminación de genes codificantes de MβLs. Esto involucra específicamente:

I.6.2.1.1. Caracterizar filogenéticamente la colección de aislamientos locales de *Pseudomonas* spp. productores de VIM-2, evaluándose para ello marcadores genéticos útiles para la asignación de especie.

I.6.2.1.2. Caracterizar plataformas portadoras de *bla*_{VIM-2} en diferentes especies de *P. grupo putida*, con énfasis en la caracterización de integrones y plásmidos.

I.6.2.1.3. Evaluar los potenciales mecanismos de movilización de *bla*_{VIM-2} entre las distintas especies de *Pseudomonas* spp. de la colección local.

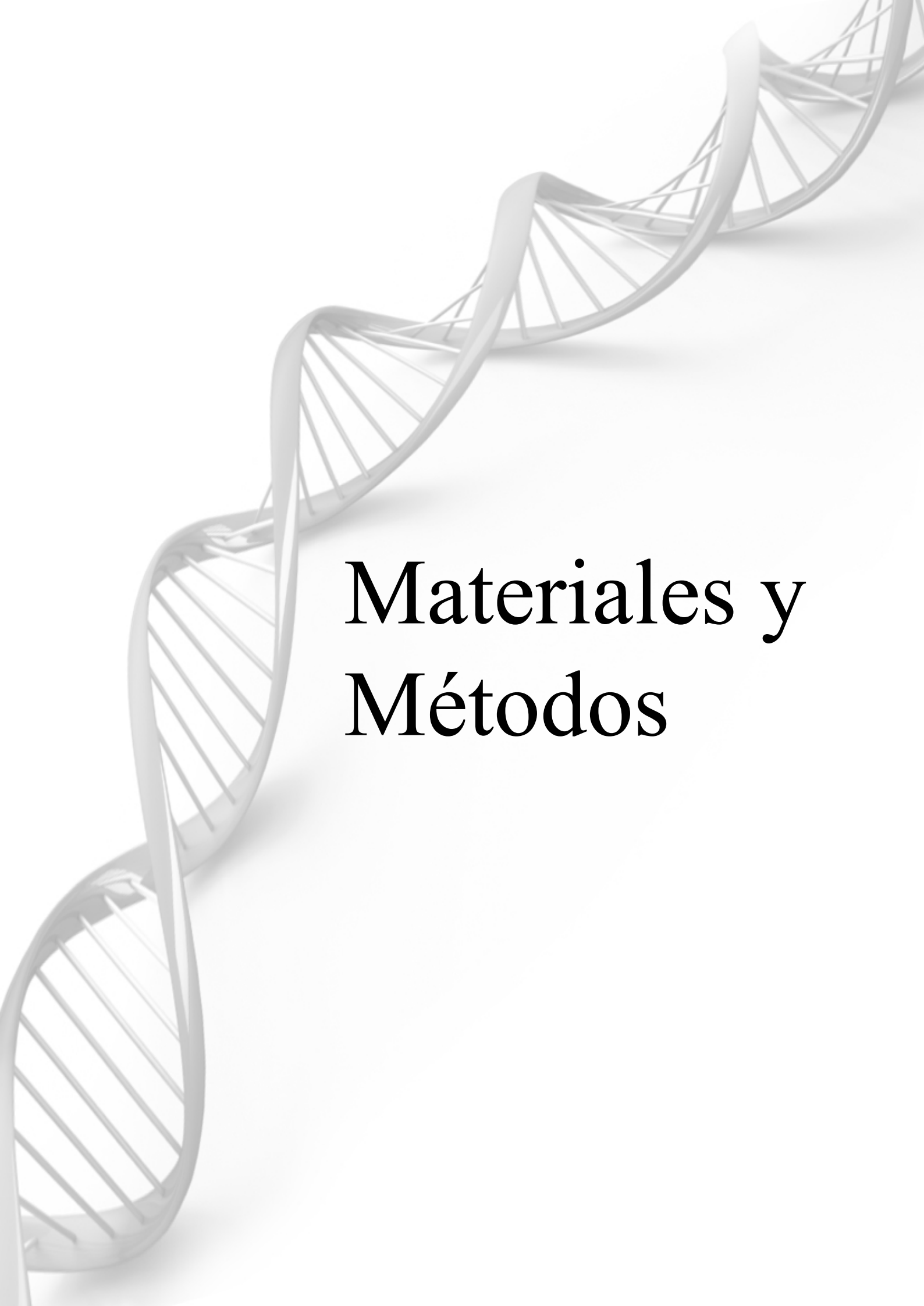
I.6.2.2. La diseminación de *bla*_{NDM-1} es actualmente una grave problemática de Salud Pública (Zhao y Hu, 2015; Dortet et al., 2016; Logan y Weinstein, 2017; Wu et al., 2019). Se ha estudiado ampliamente la diseminación de este gen de resistencia en cepas multirresistentes de

diferentes enterobacterias así como del patógeno nosocomial *A. baumannii*. Por otra parte, el creciente reporte de especies distintas a *A. baumannii* en la clínica sugiere su adaptabilidad al nicho nosocomial. En este contexto, el rol de especies escasamente reportadas en la clínica, como *Acinetobacter bereziniae*, en la formación de plataformas genéticas capaces tanto de movilizar genes de resistencia a antimicrobianos (e.g. *bla*_{NDM-1}) como asimismo adaptarse al nicho nosocomial no ha sido estudiada. Este análisis involucra específicamente:

I.6.2.2.1. Caracterizar la plataforma portadora de *bla*_{NDM-1} en un aislamiento clínico local de *Acinetobacter* no-*baumannii* (i.e. *A. bereziniae*). Para ello, se analizará el entorno genético del gen así como su localización.

I.6.2.2.2. Evaluar comparativamente *in silico* plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1} en *Acinetobacter* spp.

I.6.2.2.3. Caracterizar y evaluar comparativamente, y desde un punto de vista evolutivo, los plásmidos co-residentes de la cepa local contra diferentes bases de datos, incluyendo las de *Acinetobacter* spp no-*bereziniae*, y la específica de *A. bereziniae*.



Materiales y Métodos

II. Materiales y Métodos

II.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Se incluyeron 13 aislamientos clínicos de *Pseudomonas putida* productores de VIM-2 incluyendo LA111, LA1008, HE1012, BA7908, BA9115, BA7816, BA9713, BA9605, HB313, HB157, HP209, HP613 y HP813 y un aislamiento de *P. aeruginosa* HV868 (Tabla III.1.1), identificados en sus hospitales de origen mediante sistema automatizado VITEK-2 (bioMérieux, Francia). Los mismos fueron provenientes de materiales clínicos de pacientes internados en diferentes centros de salud de la ciudad de Rosario y alrededores, y Buenos Aires, en el período comprendido entre 2006-2014. Por otro lado, se incluyó el aislamiento clínico de *Acinetobacter bereziniae* HPC229 productor de NDM-1, recuperado de una paciente internada en el HPC en 2014, Rosario. La cepa de colección *Escherichia coli* DH5 α (F $^-$ Φ 80*lacZ*Δ*M15* Δ (*lacZYA*-*argF*) U169 *recA1**endA1**hsdR17* (rK $^-$, mK $^+$) *phoA* *supE44* λ^- *thi-1**gyrA96relA1*) y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover et al., 2000), ambas resistentes a rifampicina (Trabajo de Tesis Marchiaro, P.) se emplearon en ensayos de conjugación. Asimismo, la cepa *E. coli* DH5 α fue utilizada en experimentos de transformación y clonado. El crecimiento de las cepas se realizó en medio Luria-Bertani (LB, Sigma), siendo suplementado con los antibióticos apropiados cuando fue necesario. Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana requirieron el empleo del medio agar Mueller Hinton (MH, Sigma). Las cepas de *P. putida*, y *A. bereziniae* fueron incubadas a su temperatura óptima de crecimiento 30° C, y *P. aeruginosa* y *E. coli* DH5 α a 37° C.

II.2. Caracterización fenotípica de las cepas

II.2.1. Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos

Los ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos de las distintas cepas se realizaron mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). Se empleó el método de dilución en agar siguiendo las normas del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018). Los valores de CIM de los aislamientos clínicos y cepas curadas de plásmidos fueron efectuados mediante el sistema automatizado VITEK-2 en los laboratorios de los hospitales de origen. Asimismo, se empleó el método de difusión Kirby-Bauer como método de determinación de susceptibilidad antimicrobiana según normas del CLSI.

II.2.2. Ensayo de Sinergia: inhibición con EDTA para detectar MβLs

Brevemente, se prepara una suspensión de la cepa en estudio, a partir de una placa de cultivo de 18-24 hs de incubación, siguiendo la técnica de difusión de Kirby-Bauer (Clinical Laboratory Standards Institute, 2018). Se inocula dicha suspensión en la superficie de una placa

de agar MH. Luego se aplican sobre la superficie discos comerciales de imipenem, y de ceftazidima, y un disco de EDTA 0,5 M pH 8 (5 μ moles de EDTA/disco, Marchiaro et al., 2005). La distancia entre los 2 β -lactámicos y el disco de EDTA es de 15 mm de borde a borde. Luego, se incuban las placas a 30°C durante 24 hs. La presencia de M β LS se evidencia por la expansión del halo de inhibición entre ambos discos. Estos efectos sinérgicos (o inhibición del desarrollo bacteriano) se deben a la actividad inhibitoria del EDTA sobre la M β L producida por esta cepa.

II.3. Técnicas de Biología Molecular

II.3.1. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico

La preparación de ADN plasmídico fue realizada tanto con equipos comerciales Plasmid DNA Mini Kit I y Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega) como por métodos caseros incluyendo lisis alcalina, seguido por precipitación alcohólica (Sambrook y Maniatis, 1989).

II.3.2. Aislamiento y purificación de ADN genómico

Las preparaciones de ADN genómico fueron efectuadas utilizando el sistema comercial Wizard genomic DNA Purification Kit (Promega), según indicaciones del proveedor.

II.3.3. Determinación de la concentración y pureza de ácidos nucleicos

Las muestras de ADN plasmídico (ítem II.3.1) de *E. coli* DH5 α transformante TF7816 y ADN genómico (ítem II.3.2) de *A. bereziniae* HPC229 fueron enviadas al Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR) para su secuenciación mediante pirosecuenciación (FLX 454-ROCHE). Las muestras requirieron un índice de pureza $\geq 1,8$ y una concentración de ADN ≥ 20 ng/ μ l, para ser procesadas. Para ello, la concentración y calidad de la preparación de los ácidos nucleicos en solución fueron determinadas espectrofotométricamente (Jasco V-550). Para ello, se calculó la absorbancia a $\lambda=260$ nm y $\lambda=280$ nm, determinándose la concentración de ADN en la muestra en estudio ($\lambda=260$ nm), y el índice de pureza basado en Abs260 nm/Abs280 (Sambrook y Maniatis, 1989).

II.3.4. Ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

II.3.4.1. PCR específica

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador (MyCycler, BIO-RAD). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 μ l. Se emplearon para la mezcla 0,5 μ M de cada cebador directo y reverso, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 10 mM Tris-HCl (pH 8,4) y 50 mM KCl. Para la reacción específica de IR-HPr y VIM-Rd se empleó la mezcla 0,2 μ M de cada cebador directo y reverso, 200 μ M de cada dNTP, 2,0 mM MgSO₄, 1,0 U Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen),

1X High Fidelity PCR buffer. Las muestras de ADN empleadas como molde se obtuvieron según se describe en los ítems II.3.1 o II.3.2. Los cebadores (directos y reversos) empleados en este trabajo se detallan en Tabla II.1. Los programas empleados en las diferentes reacciones de PCR (A, B, C, D o E) se muestran en la Tabla II.2. Las variaciones de los cinco programas radican en las temperaturas de hibridación de los cebadores empleados, y tiempo de extensión (Tabla II.2).

Tabla II.1. Cebadores empleados

Nombre	Secuencia ^a (5'- 3')	Referencia
VIM-D	ATTGGTCTATTTGACCGCGT	Quinones-Falconi et al., 2010
VIM-R	CTACTCAACGACTGAGCGAT	Quinones-Falconi et al., 2010
NDM-D	GGGCA GTCGCTTCCAACGGT	Manchanda et al., 2011
NDM-R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT	Manchanda et al., 2011
IMP1-D	GAGCAAGTTATYTGTATTCT	Quinones-Falconi et al., 2010
IMP19-R	TCYMAHGTAMGYTTCAAGAG	Quinones-Falconi et al., 2010
SPM-D	GGCGCGTTTGTGTTGTTG	Quinones-Falconi et al., 2010
SPM-R	CTACAGTCTCATTTGCGCAACG	Quinones-Falconi et al., 2010
ISAbal25-D	AAAACTTGAAGTGCAGACA	Mussiet et al., 2005
16S RNA-D	AGAGTTTGATGCTGGGTGAGA	Héritier et al., 2004
16S RNA-R	ACGGYTACCTTGTTACGACTTC	Héritier et al., 2004
RpoD-D	ATYGAAAATCGCCAARCG	Mulet et al., 2013
RpoD-R	CGGTTGATKTCCTTGA	Mulet et al., 2013
GyrB-D	GCGGAAGCGGCCNGSNATGTA	Mulet et al., 2013
GyrB-R	GCATATGCANATTGCGGAT	Mulet et al., 2013
IR _{HP}	TGTCRTTTTCA GAA GACGRCTG	Marchiaro et al., 2010
TniC-D	TCGAGCTTCCACACGATCAG	Marchiaro et al., 2010
TniC-R2	CTACATGCGGGTATCGAAG	Este Trabajo
TniB-D1	CAGTGAGCAGCAATCGTCGT	Marchiaro et al., 2010
TniB-R	GACGATTGCTGCTCACTGCT	Marchiaro et al., 2010
TniA-R	CTTTCACCGCGAAGTCACTC	Marchiaro et al., 2010
VIM-Rd	ATCGCTCAGTCGTTGAGTAGC	Este trabajo
IR-HP _r	GTGCA GYCGTCTTCTGAAAAYG	Este trabajo
VIM-Dbio	Biotina-ATTGGTCTATTTGACCGCGT	Este trabajo
VIM-Rbio	Biotina-CTACTCAACGACTGAGCGAT	Este trabajo
91D	CTGCATGTACAACTGTTCAC	Este trabajo
37R	GATCCACGCATAGATACAGG	Este trabajo
91D.1	GATCTGTGAATATTGTGCGG	Este trabajo
29D	TGGATTATGAGCACCTAAG	Este trabajo
91R	TATGTCCAACCGCATAAAGG	Este trabajo
82D	CAGCTAGCTCCAGTAGTG	Este trabajo
82R	CATCTTAGATCGAGCTTTGC	Este trabajo
95D	CGTAGTGATGCCTTACATTG	Este trabajo
95R	GCAGGCTACATACTTTTCG	Este trabajo
76D1	GCTGGTGATACTGAA GAA G	Este trabajo
80R1	GGTTAGAGAGCCAGAGTTG	Este trabajo
80D2	CAGGATATAGCAACGGATCC	Este trabajo
76R2	CTCTCCCTGCACTCAATAG	Este trabajo
80D2.1	CAAAGTTGTGAAACATTGGTC	Este trabajo
80R1.1	GATCAGAGTCTAAAATTTAAC	Este trabajo
75D	CGTGGAACGTGAATAGTCAC	Este trabajo
75R	CTATCGTGGTGATGCTGAAC	Este trabajo
229P1-D	TGTATGTAAGGCGTATCGAGC	Este trabajo
229P1-R	AACGTGTCGCCAATACTGRGC	Este trabajo

^a -D: Cebador directo; -R: Cebador reverso. Y: C, T; M: A, C; H: A, T, C; R: A, G

Tabla II.2. Cebadores y programas de PCR empleados

Pares de cebadores	Programas de amplificación
VIM-D/VIM-R VIM-D/TniC-R2 TniC-D/TniB-R 16S RNA-D/16S RNA-R GyrB-D/GyrB-R NDM-D/NDM-R IMP1-D/ IMP19-R IS <i>Aba125</i> -D/NDM-R VIM-Dbio/VIM-Rbio	A) 1-1 ciclo de 3 min 94°C, 2-30 ciclos de 1 min 94°C, 1 min 55°C y 1 min 72°C, 3-1 ciclo de 10 min 72°C
IR _{HP} /VIM-R TniB-D1/IR _{HP}	B) Programa A, excepto 1 min a 56°C (hibridación)
RpoD-D/RpoD-R SPM-D/ SPM-R	C) Programa A, excepto 1 min a 49°C (hibridación)
229P1-D/229P1-R 91D/37R 29D/91R 95D/95R 82D/82R 76D1/80R1 80D2/76R2 75D/75R	D) Programa A, excepto 1 min a 52°C (hibridación)
VIM-Rd/ IR-HP _r	E) 1-1 ciclo de 5 min a 94°C, 2-35 ciclos de 30 seg 94°C, 45 seg 53°C y 1 min 68°C, 3-1 ciclo de 10 min a 68°C

II.3.4.2. PCR empleando oligonucleótidos degenerados (OD-PCR) para “fingerprinting”

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 µl. Se emplearon para la mezcla 50 ng de DNA; 2,5 U de *Taq* DNA polymerasa (Invitrogen, Life Technologies); 2,5 µM de cebador (Sigma); 200 mM dNTP; 3 mM MgCl₂; 10 mM Tris-HCl (pH 8,4)/50 mM KCl. El protocolo consistió en 5 min de desnaturalización a 95°C, 40 ciclos de 1 min a 93°C, 1,5 min a 36°C, 2 min a 72°C, seguido de 1 ciclo de 10 min a 72°C. El oligonucleótido empleado para la reacción de OD-PCR fue el cebadores 19, cuya secuencia (5'-3') es GGTCGACYTTNGYNGGRTC, donde N: A, T, C o G; Y: C o T y R: A o G (Limansky y Viale, 2002). El criterio empleado para considerar dos aislamientos como pertenecientes a diferentes clones consiste en dos bandas de diferencia como mínimo.

II.3.4.3. PCR inversa

El ensayo de PCR inversa se efectuó para identificar y amplificar regiones de ADN desconocidas de la plataforma portadora de *bla*_{VIM-2} de la cepa *P. grupo putida* HB157, de acuerdo a Ochman y cols. (Ochman et al., 1988), con modificaciones. Las muestras de ADN genómico (ítem II.3.2) de *P. grupo putida* HB157, y LD209 empleada como control, fueron

sometidas a digestiones con la enzima *EcoRI* siguiendo las condiciones del fabricante (Promega, USA). Para ello, se digirieron aproximadamente 1 µg de ADN genómico en un volumen final de 50 µl. A continuación, se precipitó el ADN agregando 0,3M de acetato de sodio, y luego dos volúmenes de etanol absoluto (-20°C). Las muestras fueron incubadas a -70°C durante 20 min y luego centrifugadas a 14.000 rpm a temperatura ambiente durante 30 min. El sedimento fue lavado con 200 µl de etanol 70% y sometido nuevamente a centrifugación en las mismas condiciones descriptas. Luego, el sedimento fue separado, secado en estufa (10 min) y resuspendido en 15 µl de H₂O miliQ. Alícuotas de 3µl tanto de la muestra incógnita como del control fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1,2% para su cuantificación, comparando las bandas generadas con un patrón conocido (fago λ digerido con *HindIII* y *EcoRI*). Los 12 µl restantes fueron sometidos a ligación de acuerdo a recomendaciones del proveedor, y a continuación, se incubaron toda la noche en heladera a 4°C. Paralelamente, se efectuó un control de ligación empleando 500 ng de fago λ digerido con *HindIII* en las mismas condiciones que las muestras. Alícuotas de 5 µl de las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa (1,2%) para visualizar si la ligación fue óptima. Por último, los fragmentos ligados de la muestra incógnita y del control fueron sometidos a PCR específica empleando los cebadores IR-HPr y VIM-Rd (ítem II.3.4.1).

II.3.5. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de amplificación obtenidos por PCR (y OD-PCR) así como los fragmentos obtenidos de las digestiones enzimáticas para el ensayo de PCR inversa se sembraron en geles de agarosa al 1,2%, mientras que las muestras de ADN genómico o plasmídico en geles al 0,8%. Los mismos fueron preparados en solución de buffer TAE 1x (40 mM Tris-AcH, pH 8, 1 mM EDTA), conteniendo 0,3 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron en el mismo buffer TAE 1x, en condiciones controladas. Como marcador de tamaño molecular se usó ADN del fago λ digerido con *HindIII* y *EcoRI*. Para la visualización del ADN se utilizó un transiluminador de luz UV (255 nm) y luego los geles fueron fotografiados.

II.3.5.1. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Se utilizó el equipo comercial GFX-PCR DNA and Gel Band-Purification Kit (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante.

II.3.6. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las extracciones plasmídicas obtenidas (ítem II.3.1) fueron utilizadas para la digestión con enzimas de restricción (*e.g.* *EcoRI*, *HindIII*, *S1*, Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega, USA).

II.3.7. Clonado de fragmentos a partir de extracción genómica. Digestión con enzimas de restricción y ligación

Las muestras de ADN genómico (ítem II.3.2) fueron digeridas con *EcoRI* siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega, USA), y luego los fragmentos ligados al vector de clonado pSU18 (Bartolome et al., 1991), que posee el gen de resistencia a cloranfenicol, en una relación inserto-vector 3:1. Las mezclas de ligación se emplearon para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , seleccionando por resistencia a ceftazidima (4 μ g/mL) y cloranfenicol (25 μ g/mL). Los plásmidos recombinantes fueron obtenidos a partir de cultivos puros provenientes de colonias aisladas mediante lisis alcalina para su posterior análisis.

II.3.8. Detección de *bla*_{VIM-2} mediante “Southern blot”

Se realizaron ensayos de “Southern blot” para la identificación de *bla*_{VIM-2} en los genomas de los aislamientos de *P. grupo putida* y *P. aeruginosa*. Para ello, se realizaron digestiones con enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos fueron sometidos a electroforesis en campo pulsado. A continuación, los geles fueron transferidos a membranas de PVDF seguido de hibridación con sonda específica de *bla*_{VIM-2}, generada mediante ensayos PCRs con el uso de los cebadores biotinilados VIM-Dbio y VIM-Rbio en el extremo 5' (Tablas II.1 y II.2). Por último, se revelaron las membranas por método colorimétrico (Sambrook et al., 1989).

II.3.8.1. Electroforesis en campo pulsado o PFGE (“pulsed field gel electrophoresis”)

Los ensayos de digestiones con enzimas de restricción seguido de PFGE se realizaron en el Servicio de Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS “Dr. Carlos G Malbrán”, Buenos Aires según recomendaciones. Los aislamientos se inocularon inicialmente en placas de TSA (“Tryptic Soy Agar”) a 30°C, durante 16-18 hs. El cultivo bacteriano fue resuspendido en 500 μ l de buffer PIV (10 mM Tris pH 8; 1M NaCl) hasta alcanzar una densidad óptica (DO₆₂₀) de 0,5-0,8 unidades en espectrofotómetro (Jasco V-550). Luego, se mezclaron 150 μ l de suspensión bacteriana, preincubada a 42°C por 10 min, con 150 μ l de agarosa “low melting” en 1,5% de buffer PIV (precalentado a 42°C). Los “plugs” o discos fueron

generados por goteo de 20 µl de la mezcla sobre un vidrio, y luego fueron incubados a -20°C por 5 min para su gelificación. A continuación, los discos fueron sometidos a lisis celular mediante su incubación a 54°C en buffer de lisis BCL-Proteinasa K (50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8; 1% Sarcosyl; 0,2 mg/ml Proteinasa K) durante 17 hs con agitación suave. Los “plugs” se lavaron dos veces con buffer TE 1X estéril (10 mM Tris; 1 mM EDTA pH 8) y se almacenaron en buffer TE 1X a 4°C hasta realizar la digestión enzimática. Las digestiones del ADN genómico se realizó con las enzimas *XbaI* y *S1*. En el primer caso, los discos fueron agregados a una solución de 150 µl conteniendo *XbaI* 20 U, buffer de restricción 1X (provisto con la enzima) y H₂O miliQ, a 37°C, durante 16-18 hs. Para las digestiones con *S1*, los discos fueron agregados a una solución conteniendo 0,5 U de *S1*, buffer de restricción 1X (provisto con la enzima) y H₂O miliQ, a 37°C, durante 45 min. Los “plugs” se colocaron en un gel de agarosa al 1,2% en buffer TBE 0,5X (5,4 g Trizma Base; 2,75 g ácido bórico; 2,0 ml 0,5 M EDTA) en un molde (BioRad) de 150 ml de 30 calles. El gel armado se colocó en un marco ubicado en la cuba de electroforesis y se realizó la corrida electroforética con un equipo de electroforesis de campo pulsado, CHEF DR III (BioRad), utilizando las siguientes condiciones: Pulso inicial, 5 seg; pulso final, 25 seg; voltaje, 6 V/cm; tiempo de corrida, 23 hs; con temperatura de buffer de corrida (TBE 0,5X) de 14°C. Como marcador de peso molecular se agregaron dos discos conteniendo el ADN de la cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup ATCC BAA664 digeridos con *XbaI*, en la primera y última calle del gel. Luego de finalizada la electroforesis, los geles fueron teñidos con BrEt 1 µg/ml, durante 20 min a temperatura ambiente con agitación suave. Para la documentación de los resultados los geles fueron fotografiados en un transiluminador de UV, utilizando foto tipo Polaroid (KODAK 665 Positivo/Negativo).

II.3.8.2. Transferencia de ADN a membrana

La transferencia de los digestos de ADN desde el gel sometido a PFGE, a membranas de PVDF (Hybond Membranes, Amersham International plc, Reino Unido) se realizó según Sambrook y cols. (Sambrook et al., 1989). Brevemente, el gel de electroforesis en campo pulsado, conteniendo las muestras de ADN genómico digeridas con las enzimas de restricción *XbaI* y *S1* (ítem II.3.8.1), fue tratado inicialmente con 0,25 M HCl para producir la hidrólisis parcial del ADN. Luego, fue sumergido en una solución alcalina desnaturizante conteniendo 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH, y posteriormente transferido a una solución conteniendo 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl (pH 7,2) y 1 mM EDTA. El ADN así tratado fue transferido a la membrana de PVDF

mediante vacío durante 2 hs, utilizándose como solución de transferencia 20X SSC (3M NaCl, 0,3 M citrato de sodio). Luego de la transferencia, se realizó la fijación alcalina del ADN a la membrana por UV (G5 Gene Linker UV Chamber, BioRad) durante 5 min a 150 mJoules.

II.3.8.3. Hibridización y detección de marca biotinilada

Las membranas de PVDF fueron incubadas con la solución de prehibridización [DENHARD 5X (0,1% de ficoll-400, 0,1% de polivinilpirrolidona y 0,1% de albúmina serica bovina), 1% SDS, 5X SSC, 0,1 mg/ml ADN desnaturalizado de esperma de salmón] dentro de los frascos de vidrio, durante 4 h a 68°C, en el horno de hibridización. Al cabo de ese tiempo, se agregaron a la solución de prehibridización 150 ng/ml de sonda *bla_{VIM-2}* biotinilada, y se continuó la incubación durante 16 h a 68°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas a temperatura ambiente, como se detalla: 1) solución A: SSC 2X, 0,1% SDS; 2) solución B: 0,2X SSC, 0,1% SDS; 3) solución C: 100mM Tris, 0,153M NaCl, 1% BSA. Las membranas fueron luego incubadas a 30°C durante 2 hs en solución C fresca, y se le agregaron 0,1 µg/ml de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina. Luego se realizaron dos lavados con solución C, y a continuación dos lavados en solución D (100mM Tris pH 9,5; 100mM NaCl; 100mM MgCl). La detección fue realizada utilizando el conjugado estreptavidina/fosfatasa alcalina, siendo los sustratos colorimétricos 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato (BCIP) y el nitroazul de tetrazolio (NBT) (Roche), siguiendo las indicaciones del proveedor. La reacción de color fue realizada incubando las membranas en la solución D, conteniendo 0,033% (p/v) NBT y 0,0165% (p/v) BCIP. El desarrollo de color fue detenido por medio de lavados con agua destilada.

II.4. Técnicas genéticas de transferencia de ADN

II.4.1. Transformación de *E. coli*

La transformación de células de *E. coli* DH5α con ADN plasmídico se realizó por choque térmico en presencia de CaCl₂ (Sambrook y Maniatis, 1989). Brevemente, se prepararon células competentes de *E. coli* DH5α y se agregaron 15µl de la mezcla de ligación o 7µl de extracto plasmídico. Luego, las células fueron expuestas a un choque térmico (4 min a 42°C) y rápidamente se agregó caldo nutritivo LB (Luria Bertani) fresco incubándose a 37°C por 1 hora. Posteriormente se bajaron las células, resuspendieron en 100 µL de LB, y se sembraron con espátula de Drigalsky sobre placas de Petri conteniendo medio LB sólido suplementado con antibiótico, según corresponda.

II.4.2. Transformación de *Acinetobacter* sp.

Los ensayos de transformación se realizaron mediante electroporación (Sambrook et al., 1989). Se prepararon células electrocompetentes de *A. bereziniae* curada (HPC229C1) y *A. baylyi* ADP1 a las cuales se les adicionó, en experimentos individuales, ADN plasmídico (ítem II.3.1) de *A. bereziniae* HPC229 (100 ng/ml) según condiciones de electroporación indicadas por los fabricantes (Gene Pulser™ System, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EEUU). Luego del choque eléctrico las células fueron suspendidas en 1 ml de medio LB fresco e incubadas toda la noche a 30°C. Posteriormente, el sedimento cosechado es sembrado con espátula de Drigalsky sobre placas de Petri conteniendo medio LB sólido suplementado con los antibióticos apropiados.

II.4.3. Ensayos de conjugación

II.4.3.1. Conjugación bipartita empleando *E. coli* DH5α o *P. aeruginosa* PAO1 como aceptoras

Los ensayos de conjugación bipartita se efectuaron empleando conjugación en placa, según Miller con modificaciones (Marchiaro et al., 2014a). Brevemente, a partir de cultivos frescos (de 24 hs) de las cepas dadoras y receptoras se preparan suspensiones en 10 ml de LB líquido con una OD_{600nm} de 0,8 para la dadora, y de 1,0 para la aceptora. Luego, se centrifugan ambas suspensiones, se descarta el sobrenadante y se resuspenden cada una en 10 ml de NaCl 0,9%. Se reitera la centrifugación, resuspendiendo finalmente cada suspensión bacteriana en 1 ml de NaCl 0,9%. La mezcla de conjugación se efectúa sobre una placa de agar LB, empleándose para la misma la proporción 15 µl/35 µl de células dadora y aceptora, respectivamente. Se procesan individualmente las células dadora y aceptora. Luego de una incubación a 30°C (para aislamientos clínicos de *P. grupo putida*, individual, o en mezcla de conjugación) o 37°C (para *E. coli* DH5α rif^R o *P. aeruginosa* PAO1 rif^R) durante 16 hs, se recogen las colonias crecidas y se colocan en tubos eppendorf de 1,5 ml con 500 µl de LB líquido para su homogenización. Se efectúan diluciones en caldo LB para siembra en placas de agar LB, conteniendo los antibióticos según corresponda. A continuación, 100 µl de las diluciones de la mezcla de conjugación (10^{-1} a 10^{-4}), así como de la dilución 10^{-2} de las células dadoras y la dilución 10^{-2} de las aceptoras, se siembran en placas de LB agar conteniendo doble selección antimicrobiana. Luego, se incuban las placas durante 24 hs a 37°C, a excepción de las placas sembradas con las cepas de *P. grupo putida*, que se incuban a 30°C. Se observan las placas conteniendo doble selección

antimicrobiana para determinar si hubo (o no) desarrollo de transconjugantes en placas sembradas con la mezcla de conjugación, y se verifica la ausencia de desarrollo bacteriano en la placa sembrada con la cepa dadora, así como en la placa sembrada con la aceptora.

II.4.3.2. Conjugación tripartita empleando *E. coli* DH5α como aceptora y *E. coli* HB101 como dadora del plásmido “helper”

Los ensayos de conjugación tripartita se efectuaron de manera similar a las conjugaciones bipartitas, con modificaciones (Marchiaro et al., 2014a). En este caso, se utilizaron como cepas dadoras *A. bereziniae* HPC229, que posee el plásmido movilizable pNDM229 (Brovedan et al., 2015), así como *E. coli* HB101 poseedora del plásmido “helper” que contiene el SST4 completo para mediar en *trans* la movilización de plásmidos putativamente movilizables (*e.g.* pNDM229), mientras que la aceptora final es *E. coli* DH5α. En este caso, los cultivos fueron procesados de la misma manera que en las conjugaciones bipartitas teniendo en cuenta que en este caso, hay dos dadoras y una aceptora (ítem II.4.2.1). Las mezclas de conjugación se efectúan sobre una placa de agar LB, empleándose para la misma 15 µl/35 µl de células dadoras y aceptora. En este caso, la incubación es a 30°C para *A. bereziniae* HPC229 (individual, o en mezcla de conjugación) o 37°C (para *E. coli* DH5α o HB101) durante 16 hs, se recogen las colonias crecidas y se colocan en tubos eppendorf con LB líquido (ítem II.4.2.1). El resto del procedimiento es análogo a las conjugaciones bipartitas (ítem II.4.2.1).

II.4.4. Técnica de curado de plásmidos

La localización de *bla*_{NDM-1} fue efectuada por ensayos de transferencia de ADN (ítem II.4.1), como así también por la técnica de curado de plásmidos. Esta última fue realizada según Lopes y cols. (Lopes et al., 2012), con modificaciones. Brevemente, 200 µl de un cultivo incubado durante toda la noche de *A. bereziniae* HPC229 se inoculó en 5 ml de caldo LB conteniendo 0,4% de SDS, incubándose luego a 40°C en un agitador durante 48 hs. A continuación, se plaquearon 100 µl de la suspensión bacteriana en una placa de LB agar durante 24 hs a 30°C. Las colonias crecidas fueron repicadas utilizando palillos estériles en placas de LB agar (con y sin ceftazidima, 128 µg/ml). Las colonias que crecieron en las placas de LB agar y no en aquellas con el agregado de antibiótico, corresponden a las que perdieron el plásmido, por tanto “curadas” del plásmido portador de la resistencia antimicrobiana de interés. La susceptibilidad a los antibióticos de las colonias curadas fue confirmada por VITEK-2, y ensayos

microbiológicos (ítem II.2.2.). El análisis de la identidad clonal entre las bacterias curadas y la parental se estableció mediante OD-PCR (ítem II.3.4.2).

II.5. Identificación taxonómica de los aislamientos clínicos incluidos en este trabajo

II.5.1. Caracterización de aislamientos de *P. grupo putida* basada en espectrometría de masa

La clasificación de los aislamientos basada en análisis proteómicos se efectuó mediante MALDI-TOF MS (“matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry”, en español: desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo). Este sistema se basa en el análisis de proteínas, esencialmente las ribosomales, mediante la generación de espectros de masa, específicos para ciertos géneros y especies (Maldonado et al., 2018). Los aislamientos clínicos de *P. grupo putida* de este estudio (Tabla III.1.1) fueron sometidos a identificación según MALDI-TOF-MS (MALDI Biotyper, Bruker Daltonik) en el CEMAR (Centro de Especialidades Médicas Ambulatorias de Rosario, Departamento de Salud Pública Municipal, Rosario) según recomendaciones del fabricante. Una elevada probabilidad de identificación a nivel de especie según estas recomendaciones es compatible con valores superiores a 2,3; mientras que para valores entre 2-2,3, la identificación a nivel de género es segura, y probable a nivel de especie. El Manual de Interpretación de resultados de MALDI-TOF MS (Rocca et al., 2018) indica que valores de “score” superiores a 2,0 resultan confiables para la identificación bacteriana a nivel de especie para *Pseudomonas*. Estas recomendaciones incluyen informar a nivel de grupo (*P. grupo putida*) a las siguientes especies, *P. plecoglossicida*, *P. monteilii*, *P. mossellii*, *P. putida*, y *P. fulva*. En estas especies no se puede alcanzar la diferenciación por pruebas fenotípicas ni por secuenciación del ARNr 16S. Se recomienda *gyrB* y *rpoD* para confirmar (Mulet et al., 2010; Mulet et al., 2013).

II.5.2. Caracterización de los aislamientos de *P. grupo putida* basada en MLSA

MLSA (por “multilocus sequence analysis”) es la metodología de elección para la discriminación de especies en *Pseudomonas* spp. y está basada en el análisis de los marcadores ARNr 16S, *gyrB*, *rpoB* y/o *rpoD* (Mulet et al., 2010; Mulet et al., 2012; Mulet et al., 2013; Peix et al., 2017). En este trabajo, fue realizado según Mulet y cols. (Mulet et al., 2013) con modificaciones. Brevemente, se amplificaron las secuencias parciales de los marcadores ARNr 16S, *gyrB* y *rpoD* de los aislamientos en estudio (Tabla III.1.1) mediante PCR con cebadores específicos (Tablas II.1 y II.2). Las secuencias generadas (ítem II.5.1) fueron analizadas luego de

su secuenciación, y alineadas utilizando las herramientas bioinformáticas SeqBuilder y MegAlign (Lasergene), respectivamente. Las secuencias parciales del ARNr 16S (1.301 nt), y de los genes “housekeeping” *gyrB* (669 nt) y *rpoD* (677 nt) fueron concatenadas en el siguiente orden ARNr 16S-*gyrB*-*rpoD*-*rpoB*, totalizando una secuencia de 2.647 nt. Igual estrategia fue efectuada con cepas tipo de *P. grupo putida*, como de especies no relacionadas filogenéticamente, *P. aeruginosa* y *P. oryzihabitans*; así como de cepas de nuevas especies de *P. grupo putida* propuestas por Mulet y cols. (Mulet et al., 2013) depositadas en base de datos del NCBI (GenBank). Las secuencias parciales de los marcadores ARNr 16S, y de los genes *gyrB* y *rpoD* de los aislamientos de este estudio fueron depositados en base de datos del NCBI (Tabla A.1). Los números de acceso de las secuencias de las cepas utilizadas se indican entre paréntesis e incluyen a *P. putida* ATCC 12633^T (AP013070.1), *P. alkylphenolia* JCM 16553^T (CP009048.1), *P. entomophila* L48^T (CT573326.1), *P. taiwanensis* DSM 21245^T (NZ_AUEC000000000.1), *P. parafulva* DSM 17004^T (NZ_AUEB000000000.1), *P. fulva* ATCC 31418^T (NZ_JHYU000000000.1), *P. mosselii* ATCC BAA-99^T (NZ_JHYW000000000.1), *P. plecoglossicida* ATCC 700383^T (NZ_JHYX000000000.1), *P. monteilii* ATCC 700476^T (NZ_JHYV000000000.1), *P. cremoricolorata* DSM 17059^T (NZ_AUEA000000000.1), *P. vranovensis* DSM 16006^T (NZ_AUED000000000.1), *P. japonica* JCM 21532^T (NZ_BBIR000000000.1), *P. donghuensis* HYS^T (AJJP000000000.1), *P. guariconensis* PCAVU11^T (FMYX000000000.1), *P. soli* LMG 27941^T (FOEQ000000000.1), *P. hunanensis* LV^T (JX545210.1, JX545211.1, KP151501), *P. reidholzensis* CCOS 865^T (LT009707, LT009711, LT009713), *P. wadenswilerensis* CCOS 864^T (LT009706, LT009708, LT009710), *P. aeruginosa* ATCC 10145^T (NZ_CP012001.1), *P. oryzihabitans* ATCC 43272^T (NZ_BBIT000000000.1), *P. grupo putida*/I KT2440^b (AE015451.1), *P. grupo putida*/II ATCC 23483 (U70977.1, HF545867.1, HF545853.1), *P. grupo putida*/III IFO 14671 (D85998, D86028, D86011), *P. grupo putida*/IV CFBP 4966 (HF545842, HF545856, HF545870), *P. grupo putida*/V W619 (NC_010501), *P. grupo putida*/VI IFO 3738 (D85999, D86029, D86012). Las secuencias concatenadas totales se alinearon utilizando ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>), y los valores de similitud generados fueron utilizadas para establecer la pertenencia a *P. grupo putida*, así como a cada especie en particular. Los criterios establecidos son similares a los propuestos por Mulet y cols. (Mulet et al, 2013) con modificaciones: i) identidad del concatenado $\geq 88,3$ % para pertenecer a *P. grupo putida*, el cual constituye el mínimo valor observado entre las especies más distantes (*i.e.* los % de identidad de cualquier miembro de *P. grupo putida* respecto a los observados para

P. aeruginosa o *P. oryzihabitans* son menores a 88,3); y ii) identidad del concatenado $\geq 97,5\%$ para pertenecer a alguna especie que conforma al *P.* grupo *putida*. Asimismo, el alineamiento generado fue utilizado para análisis filogenéticos utilizando el programa MEGA6.06 (Tamura et al., 2013). Para ello, se determinó el mejor modelo de sustitución, empleando MEGA6.06, el cual fue GTR+G+I teniendo en cuenta el criterio de información de Akaike (AIC), y luego se generó un árbol filogenético aplicando el método “Maximun-Likelihood” (ML). Los valores de “bootstrap” para 1000 réplicas se indican en los nodos de ramificación del árbol generado. El análisis de los porcentajes de identidad obtenidos en concordancia a los clados generados en el dendrograma permitió asignar correctamente los aislamientos clínicos bajo estudio, a las distintas especies del grupo.

II.6. Secuenciación de ADN

II.6.1. Secuenciación por el método de Sanger

La secuenciación de los fragmentos de ADN, ya sean derivados de clonados en vectores o amplicones obtenidos por PCR, así como la secuenciación por “Primer Walking” (*i.e.* caminata con cebadores) con cebadores específicos, fueron realizadas en el Servicio de Secuenciación, de la Universidad de Maine (Maine DNA Sequencing Facility, Florida, EEUU). Las muestras de ADN así como los cebadores han sido enviados siguiendo las recomendaciones sugeridas. La purificación de las bandas se efectuó según lo descrito más arriba (ítem II.3.5.1). Las secuencias obtenidas a partir de las dos hebras de ADN complementarias fueron alineadas utilizando el programa EditSeq (Lasergene, DNASTAR®). La secuencia consenso resultante fue empleada para los subsiguientes análisis.

II.6.2. Secuenciación completa de ADN genómico y ADN plasmídico

Las muestras de ADN plasmídico (ítem II.3.1) derivadas de la transformación de *E. coli* DH5 α con extractos plasmídicos del aislamiento *P.* grupo *putida*/IV BA7816 portadora de *blavim*-2, así como ADN genómico (ítem II.3.2) de *A. bereziniae* HPC229 fueron enviadas para su secuenciación (FLX 454, ROCHE, Instituto de Agrobiotecnología Rosario INDEAR, <http://webservices.indear.com>). El alcance de cobertura del genoma de HPC229 fue de 22.0x conteniendo en total 134 contigs. El tamaño molecular estimado del genoma fue de 4,6 Mpb y un contenido de G+C de 37,6 %. Por otro lado, el alcance de cobertura del plásmido de BA7816 fue de 40.0x conteniendo en total 3 contigs. El tamaño molecular del plásmido fue en total 38 kpb y un contenido de G+C de 52,2 %. El método utilizado para el ensamble de los contigs a partir de

las “reads” o datos obtenidos luego de la secuenciación fue Newbler versión 2.9 para el genoma de HPC229, mientras que se usó la versión 2.5.3 para el plásmido de BA7816.

II.7. Herramientas bioinformáticas

II.7.1. Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

Las secuencias nucleotídicas obtenidas de las secuenciaciones por el método de Sanger como así también derivadas de pirosecuenciación fueron visualizadas y analizadas utilizando SeqBuilder (Lasergene).

II.7.2. Predicción de CDS (“coding sequences”) y de marcadores plasmídicos

La predicción de genes para funciones conocidas así como la visualización y análisis de los distintos contigs fue realizado mediante el depósito de los datos obtenidos según RAST (“Rapid Annotation using Subsystem Technology standard operating procedures”; Aziz et al., 2008). Asimismo, la detección de contigs conteniendo secuencias plasmídicas fue inicialmente realizada mediante la búsqueda de marcadores plasmídicos (*e.g.* genes *rep*, *parA*, *parB*, *mobA*, y genes del sistema TA) con esta herramienta.

II.7.3. Identificación y alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas. Marcadores plasmídicos e iterones

El análisis de las secuencias se efectuó mediante las distintas herramientas de Blast (Basic local alignment search tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul et al., 1990). Análisis comparativos de las secuencias nucleotídicas de los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229 contra bases de datos del NCBI (GenBank) así como análisis comparativos de pBA7816 derivado de *P. grupo putida*, contra los plásmidos ya caracterizados pLD209 (Marchiaro et al., 2014a) y pLA111 provenientes de *P. grupo putida* (María S. Díaz, Trabajo Final Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica) fueron realizados mediante BlastN. La búsqueda de funciones conocidas para los CDS (o marcos abiertos de lectura, “orf” por “open reading frames”) predichos como proteínas hipotéticas por RAST (ítem II.6.2) fueron efectuados mediante BlastX. Asimismo, el análisis de dominios conservados de las proteínas predichas por RAST (ítem II.6.2) requirió el empleo de BlastP. En todos los casos, se utilizaron condiciones de búsquedas estándar y se consideraron valores significativos cuando el E-value resultante de cada búsqueda es inferior a $1e-5$. Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se realizó mediante ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) en condiciones estándar.

La estrategia desarrollada para la detección de contigs que contienen secuencias plasmídicas (ítem II.6.2) fue complementariamente efectuada utilizando diversas herramientas bioinformáticas incluyendo el buscador de marcadores plasmídicos de enterobacterias, Plasmid Finder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>); y los buscadores de sistemas toxina-antitoxina, TA, RASTA-Bacteria (<http://genoweb1.irisa.fr/duals/RASTA-Bacteria/>; Sevin y Barloy-Hubler, 2007) y TADB (<http://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB2/>; Xie et al., 2018). En todos los casos, se emplearon condiciones estándares y se consideraron valores significativos cuando el E-value resultante de cada búsqueda es inferior a $1e-5$. Los genes detectados fueron posteriormente utilizados para el análisis de los dominios conservados según Pfam (<https://pfam.xfam.org/>, Finn et al., 2016) y BlastP (ítem II.6.3). Además, la predicción de iterones plasmídicos fue realizada mediante Tandem Repeats Finder (<https://tandem.bu.edu/trf/trf.html>; Benson et al., 1990) en condiciones estándares.

II.7.4. Contenido G+C, “GC skew” y origen de replicación de los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229. Análisis comparativo de los plásmidos contra genomas de *A. bereziniae*.

El análisis del contenido G+C así como del “GC skew” de los plásmidos de HPC229 fue realizado utilizando las herramientas bioinformáticas “GCview” (<http://cgview.ca/>; Grant y Stothard, 2008) y GenSkew (<http://genskew.csb.univie.ac.at/>), respectivamente. El origen de replicación en los plásmidos pAbe229-4 y pAbe229-1 fue predicho a través del análisis del “GC skew” acumulativo según “GenSkew” (parámetros establecidos: “Window size”: 20; “Step size”: 2). El análisis comparativo de los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229 contra los genomas de *A. bereziniae* por BlastN (algoritmo incorporado en este programa, E-value empleado $1e-15$) fue efectuado mediante “GCview”.

II.7.5. Identificación de genes de resistencia, transportadores de membrana y fagos

La búsqueda de genes de resistencia fue efectuada según ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>; Kleinheinz et al., 2014). La predicción de los transportadores de membrana de los plásmidos de HPC229 fue realizada según TCDB (“Transporter classification database”, <http://www.tcdb.org/>; Saier et al., 2016). La búsqueda de proteínas fágicas y de islas genómicas se realizó mediante IslandView4 (Bertelli et al., 2017) y PHASTER (Arndt et al., 2016), respectivamente. En todos los casos se utilizaron parámetros estándares.

II.7.6. Identificación de secuencias de inserción y registro de transposones

La predicción de las secuencias de inserción en los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229 fue efectuada mediante ISFinder (<http://www-is.biotoul.fr/>; Siguier et al., 2006). Asimismo, la designación de IS*Abe18* presente en pAbe229-114 derivado de esta cepa, fue provista por los curadores de ISFinder. El registro de los transposones Tn6335, y Tn6336 derivados de cepas clínicas de *P. grupo putida* fue realizado de acuerdo a las pautas del registro nomencado internacionalmente, según “Tn Number Registry” (<http://transposon.lstmed.ac.uk/>; Roberts et al., 2008).

II.7.7. Identificación de sitios XerC/D en los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229

La detección de sitios XerC/D fue realizada inicialmente mediante la búsqueda del patrón de reconocimiento ambiguo 5'-NNTNYKYATAANNNNYWTATSTKAWNN-3' (donde Y=C/T, K=G/T, W=A/T, S=G/C, N=A/T/C/G) generado en estudio previos en plásmidos de *A. baumannii* (Cameranesi et al., 2018) empleando Fuzznuc (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/fuzznuc>) con parámetros estándares. La inspección visual de las secuencias nucleotídicas de los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229 permitió identificar sitios XerC/D adicionales, los cuales no fueron reconocidos con el patrón descripto. Los sitios XerC/D con cr6 (6 nt en la región central) detectados por ambos métodos se utilizaron para inferir el sitio de reconocimiento XerC/D consenso de los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229 (5'-DHWYCKHATAANNNNNNNTTATGTAAADTT-3'; donde D=A/G/T, H=A/C/T), que posteriormente se utilizó como molde para la búsqueda de sitios XerC/D en los genomas de *A. bereziniae* bajo estudio. Además, se construyó un logotipo para representar gráficamente la frecuencia de los nt en cada una de las posiciones de los sitios XerC/D de *A. bereziniae* mediante la herramienta disponible en <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>.

II.7.8. Cálculo del parámetro orthoANI (por “orthology Average Nucleotide Identity”)

La asignación a nivel de especie de *Acinetobacter* sp WC-743 y *Acinetobacter* sp Ag2 a *A. bereziniae* fue realizado en este trabajo mediante el cálculo del valor de orthoANI (Lee et al., 2016). Este parámetro es una medida robusta y confiable que mide la similitud genética entre dos conjuntos de secuencias nucleotídicas de especies, o de cepas de la misma especie, siendo también utilizado para determinar divergencia genética (Lee et al., 2016). Brevemente, cada par de genomas, genoma en estudio contra la cepa de referencia de *A. bereziniae* CIP 70.12 (Nemec et al., 2010) se fragmentó, *in silico*, en segmentos de aproximadamente 1.020 pb, los cuales

fueron utilizados para realizar análisis mediante el algoritmo BlastN bidireccional tomando como valor de corte 70% de identidad. Solo aquellos pares de fragmentos ortólogos obtenidos fueron utilizados para calcular los valores de orthoANI. Se ha establecido que un valor de orthoANI de 94-95% (Chan et al., 2012) corresponde al tradicional 70% del método de hibridación ADN-ADN de determinación de especie bacteriana. En este trabajo se validaron los valores obtenidos, mediante el cálculo de orthoANI utilizando dos genomas de cepas control, filogenéticamente relacionadas con *A. bereziniae*, como *A. guillouiae* CIP 63.46 y *A. gernerii* DSM 14967 (Nemec et al., 2010; García-Garcera et al., 2017). Por tanto, si dos genomas comparten un valor de orthoANI mayor a 94-95% pertenecen a la misma especie. Las determinaciones de este parámetro fueron realizadas en colaboración con el Dr. Martín Espariz (IBR-CONICET).

II.7.9. Clasificación de los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229

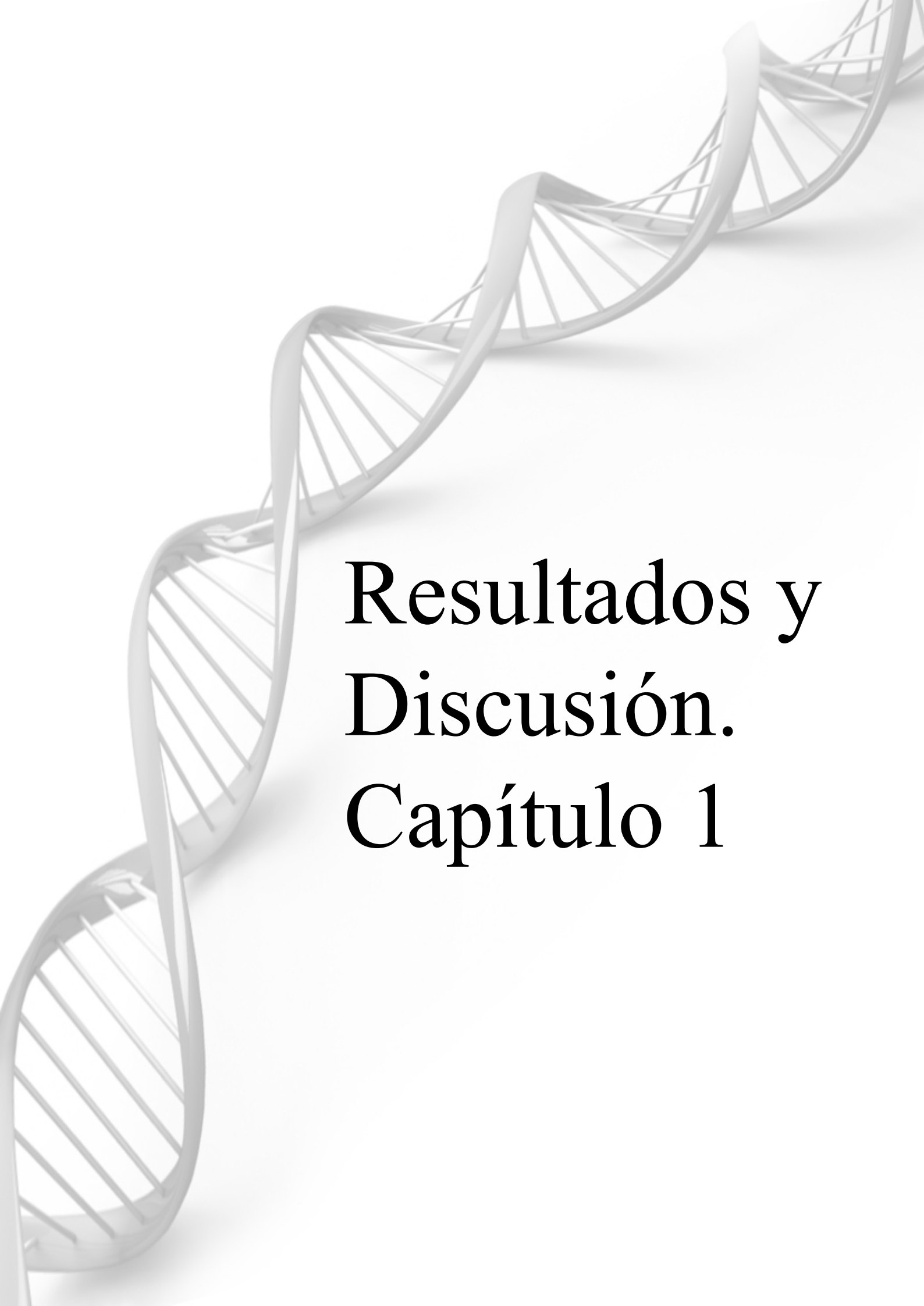
II.7.9.1. Clasificación basada en la comparación de las secuencias de las replicasas

La clasificación de las replicasas de los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229 así como aquellas halladas en los genomas de *A. bereziniae* se basó en la comparación de las secuencias aminoacídicas contra base de datos de replicasas de *Acinetobacter* spp. (Salto et al., 2018). Se decidió seguir el esquema recientemente propuesto por Salto y cols. (Salto et al., 2018) ya que incluye las replicasas de numerosos plásmidos de *Acinetobacter* spp., en contraste con el sistema de Cameranesi y cols. (Cameranesi et al., 2017) que solo se centra en replicasas de plásmidos de *A. baumannii*. Inicialmente, se construyó una base de datos local que incluye las secuencias de replicasas reportadas en el trabajo mencionado (Salto et al., 2018). Luego, se realizó una búsqueda de replicasas putativas codificadas en los genomas de *A. bereziniae* disponibles en el NCBI (GenBank), en base a la presencia de dominios de replicasa plasmídica conocidos según Marchler-Bauer y cols. (Marchler-Bauer et al., 2015). Las secuencias de replicasas plasmídicas seleccionadas se utilizaron luego para análisis complementarios mediante BlastP (valor de corte del 60%) empleando la base de datos local, y posteriormente se asignaron a los grupos correspondientes de *Acinetobacter* Rep-3, AR3G (Salto et al., 2018).

II.7.9.2. Clasificación basada en análisis filogenético de las secuencias de relaxasas

La clasificación de las relaxasas de los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229 así como aquellas halladas en los genomas de *A. bereziniae* se basó en la comparación de las secuencias aminoacídicas de las relaxasas en base a familias y subfamilias MOB, siguiendo el procedimiento propuesto por Garcillán-Barcia y cols. (Garcillán-Barcia et al., 2011), y actualizado con la base de

datos de Salto y cols. (Salto et al, 2018). Metodológicamente, se realizó de manera análoga a lo realizado con las replicasas (ítem II.7.9.1). Se construyó una base de datos local que incluye las proteínas MOB reportadas en los trabajos citados, y aquellas identificadas con dominios conservados en los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229 y en los genomas de *A. bereziniae*. Entre las 12 relaxasas putativas identificadas por este procedimiento, solo una (TraI codificada en pAbe229-114) mostró el dominio conservado de relaxasa/nucleasa (pfam03432), mientras que las otras once mostraron el dominio MobA/MobL (pfam03389). Estas últimas proteínas fueron las seleccionadas para los análisis filogenéticos subsiguientes. Para ello, los últimos 300 aminoácidos del N-terminal de cada una de estas proteínas se alinearon utilizando ClustalW del programa MEGA6.06 (Tamura et al., 2013) con parámetros estándares. Para determinar el mejor modelo de sustitución, se utilizó la herramienta incluida en MEGA6.06. Así, se eligió el modelo de sustitución LG+G+I teniendo en cuenta el criterio de información de Akaike (AIC), y luego se generó un árbol filogenético aplicando el método “Maximun-Likelihood” (ML). Los valores de “bootstrap” para 100 réplicas se indican en los nodos de ramificación del árbol generado. En el caso de la relaxasa TraI de pAbe229-114, la clasificación se realizó utilizando la máxima identidad según BlastP, empleando la base de datos local de relaxasas.



Resultados y Discusión. Capítulo 1

III.1. Capítulo 1

Diseminación de *bla*_{VIM-2} mediada por transposones tipo-Tn402 en aislamientos clínicos de *Pseudomonas* spp.

III.1.1. Introducción

La emergencia de la resistencia a carbapenemes en BGN de importancia clínica, incluyendo enterobacterias y BNF como *P. aeruginosa* y *A. baumannii* causa un impacto significativo en el tratamiento de infecciones hospitalarias así como morbi-mortalidad asociada (Patel y Bonomo, 2013). El principal mecanismo de resistencia a estos antimicrobianos en BGN es la producción de β -lactamasas, siendo las M β LS adquiridas de gran relevancia clínica debido a que pueden hidrolizar la mayoría de los β -lactámicos incluyendo carbapenemes, y aún no se cuentan con inhibidores de uso clínico (Nordmann et al., 2012). Entre las diferentes familias de M β LS adquiridas identificadas al presente, las de tipo -IMP, -VIM, y NDM son las mayormente reportadas (Logan y Weinstein; 2017). En particular, la variante VIM-2 es la enzima tipo-VIM prevalente en el mundo, y detectada principalmente en aislamientos de *P. aeruginosa* (Patel y Bonomo, 2013; Logan y Weinstein; 2017). Esta variante asimismo se ha reportado en aislamientos de enterobacterias y otros BNF como *Acinetobacter* spp. (e.g. *A. baumannii*, *A. bereziniae*, *A. pittii*) y *Pseudomonas* spp. (e.g. *P. putida*, *P. stutzeri* y *P. fluorescens*) (Zhao y Hu, 2011; Marchiaro et al., 2014b; Escandón-Vargas et al., 2016; Loucif et al., 2017). En este contexto, algunos autores han hipotetizado que *P. putida* constituiría un reservorio ambiental de genes codificantes de M β LS, entre ellos *bla*_{VIM-2} (Almuzara et al., 2007; Juan et al., 2010; Santos et al., 2010; Marchiaro et al., 2014a).

La identificación bacteriana basada en métodos fenotípicos incluyendo pruebas manuales convencionales, sistemas comerciales multipuebas (e.g. API, biomèrieux; RapID systems y MicroID, Remel), o sistemas automatizados (e.g. VITEK-2, biomèrieux; MicroScan, DADE BEHRING INC; Phoenix™, Becton Dickinson), se han usado ampliamente para la detección de especies de *Pseudomonas* (Almuzara et al., 2007; Juan et al., 2010; Santos et al., 2010; Marchiaro et al., 2014a; Hong et al., 2018). Métodos basados en proteómica como la espectrometría de masa MALDI-TOF MS (por "matrix-assisted laser-desorption time-of-flight mass spectrometry") han irrumpido en el área del diagnóstico microbiológico exhibiendo resultados satisfactorios para la identificación de la mayoría de las especies de *Pseudomonas* spp. (Mulet et al., 2012). Sin embargo, requiere bases de datos actualizadas para especies que conforman complejos bacterianos dentro del género (e.g. *P. grupo putida*). Los problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica, y las limitaciones en las bases de datos de bacterias correspondientes a

algunos grupos bacterianos han impulsado el desarrollo de métodos genotípicos de identificación bacteriana (Bou et al., 2011; Mulet et al., 2013; Mulet et al., 2017; Peix et al., 2017). Entre ellos, el MLSA (por “multilocus sequence analysis”) es la metodología de elección para la discriminación de especies en *Pseudomonas* spp. y está basado en el análisis de secuencia de genes “housekeeping”, incluyendo al ARNr 16S, *gyrB* (codificante de la subunidad B de la ADN girasa), *rpoB* (codificante de la subunidad β de la ARN polimerasa), y *rpoD* (codificante del factor sigma 70 de la ARN polimerasa) (Mulet et al., 2010; Mulet et al., 2012; Mulet et al., 2013; Peix et al., 2017). Este sistema ha definido diferentes grupos, subgrupos y especies dentro del género *Pseudomonas* a partir del análisis de las secuencias concatenadas de los marcadores mencionados en el siguiente orden: ARNr 16S-*gyrB*-*rpoD*-*rpoB* (Gomila et al., 2015). Asimismo, ha sido documentado que entre los diferentes marcadores utilizados, *rpoD* fue es más confiable para la discriminación de especies bacterianas en *Pseudomonas*, seguido por *gyrB*, y por último *rpoB* (Mulet et al., 2010; Mulet et al., 2017; Peix et al., 2017). Así, los análisis por MLSA han definido a *Pseudomonas* grupo *putida* (*P.* grupo *putida*) como un grupo de especies relacionadas filogenéticamente con *P. putida*. Dentro del mismo se encuentra a *P. putida* y otros 17 miembros: *P. alkylphenolia*, *P. cremoricolata*, *P. donghuensis*, *P. guariconensis*, *P. entomophila*, *P. fulva*, *P. hunanensis*, *P. japonica*, *P. monteilli*, *P. mosselii*, *P. parafulva*, *P. plecoglossicida*, *P. reidholzensis*, *P. soli*, *P. taiwanensis*, *P. vranovensis*, y *P. wadenswilerensis* (Peix et al., 2017). En este contexto, es importante destacar que reportes previos que postulan a *P. putida* como reservorio de genes de resistencia (Almuzara et al., 2007; Juan et al., 2010; Santos et al., 2010; Marchiaro et al., 2014a) han caracterizado los aislamientos a través de sistemas de identificación bacteriana basados en métodos fenotípicos, como VITEK-2, cuya base de datos no posee la totalidad de especies del *P.* grupo *putida* y por lo tanto la identificación de los aislamientos como *P. putida* no es certera (Mulet et al., 2010; Mulet et al., 2013; Mulet et al., 2017; Peix et al., 2017). Así, el rol de las diferentes especies del *P.* grupo *putida* como reservorios de genes de resistencia es aún motivo de estudio.

VIM-2 es la M β L prevalente en nuestro país (De Belder et al., 2017) y una de las M β L más reportadas en el mundo (Patel y Bonomo, 2013; Escandón-Vargas et al., 2016). Es posible que plataformas de elevada movilidad constituyan la base racional de la elevada diseminación de este gen de resistencia entre cepas de *P.* grupo *putida*, como ejemplo de un reservorio ambiental; y entre dichos reservorios con patógenos oportunistas como *P. aeruginosa* y enterobacterias. Numerosos estudios mostraron que los genes codificantes de la mayoría de las M β LS adquiridas se hallan

asociados mayoritariamente a integrones de clase 1, los cuales a su vez se integran a EGM como transposones y/o plásmidos, que se diseminan luego por THG. Modelos evolutivos de integrones clase 1 documentan que el Tn402 constituiría el ancestro de los integrones de clase 1 clásicos e inusuales (ítem I.4.1.2.2). Sin embargo, ambos integrones presentan diferencias sustanciales en el extremo 3'. Los clásicos son denominados así, por ser los más descriptos al presente, y presentan el segmento 3' conservado (3'CS) (ítem I.4.1.2). Por su lado, los inusuales, menos documentados, se caracterizan por poseer configuraciones genéticas variables en el extremo 3', exhibiendo vestigios más evidentes del módulo *tni* del Tn402, y globalmente son denominados integrones/transposones tipo-Tn402 (ítem I.4.1.2.2) (Di Conza y Gutkind, 2010; Gillings et al., 2014). Ambas clases de integrones serían incapaces de transponer a causa de delecciones parciales de genes del módulo *tni* (*i.e.* genes *tniC*, *tniQ*, *tniB* y *tniA*). Sin embargo, estas estructuras suelen conservar repeticiones invertidas IRs inicial y terminal (IRi e IRt) en sus extremos, lo que les otorgaría capacidad para integrarse en otros elementos, siempre que las funciones de transposición sean provistas en *trans* por otros transposones funcionales (ítem I.4.1.2.2.2). Al presente, son escasos los trabajos que describen integrones/transposones tipo-Tn402 con módulo *tni* completo e IRs en los extremos; lo que ha reforzado la hipótesis del modelo evolutivo que sustenta que los mismos son ancestrales y que han evolucionado hacia estructuras incapaces de transposición autónoma (Stokes et al., 2006; Post et al., 2007; Samuelsen et al., 2009; Juan et al., 2010; Betteridge et al., 2011; Gillings, 2014). En este contexto, ha constituido de interés particular en este Trabajo de Tesis la caracterización de estructuras de integrones/transposones tipo-Tn402 con extremo 3' compatible con integrones inusuales, portadoras de *bla*_{VIM-2}, incluyendo su localización genética y potenciales mecanismos de diseminación, de manera de evaluar si la presencia de transposones es al presente subdiagnosticada así como de proveer evidencias de la diseminación de estos EG entre cepas de diferentes especies de *Pseudomonas* spp. Para ello, el laboratorio cuenta con una colección de 13 aislamientos clínicos de *P. putida* portadores de *bla*_{VIM-2} con extremo 3' asociado a integrones inusuales (Tabla III.1.1). Los mismos provienen de pacientes asistidos en hospitales de Rosario y Buenos Aires entre 2006-14. La identificación inicial de dichos aislamientos se realizó en sus hospitales de origen mediante VITEK-2 (Biomérieux). Desde una óptica clínica, la correcta identificación a nivel de especie de cepas clínicas es esencial para establecer los patrones de resistencia a los antibióticos intrínsecos y mejorar los planes de tratamiento (Mulet et al., 2017); y desde un punto de vista básico, la correcta clasificación a nivel de especies es un requisito necesario para estudios de diversidad genética así como evolutivos (Gomila et al., 2015). En este contexto,

la asignación de especie de estos aislamientos se abordó mediante análisis filogenéticos empleando tres marcadores moleculares conservados, ARNr 16S, *gyrB* y *rpoD*, según el esquema actual propuesto por Mulet y cols. (Mulet et al., 2013). Estos estudios aportarán evidencias sobre el rol de las diferentes especies del *P. grupo putida* como reservorio ambiental de genes de resistencia, y en este contexto, se evaluará la capacidad de este grupo bacteriano para el reclutamiento y ensamble de dichos genes en sistemas de transferencia compatibles con patógenos oportunistas como *P. aeruginosa*.

Trabajos previos realizados en el laboratorio abordaron la caracterización preliminar de las plataformas genéticas de movilización de *bla_{VIM-2}* en aislamientos de nuestra colección (Tabla III.1.1., Marchiaro et al., 2010; Marchiaro et al., 2014a; María S. Díaz, Trabajo Final Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica). La cepa clínica *P. putida* LD209 ha sido reportada como portadora de un elemento genético novedoso (Marchiaro et al., 2014a), caracterizado como un integrón/transposón tipo-Tn402 portador de *bla_{VIM-2}* que presenta la maquinaria completa de transposición, y repeticiones invertidas (IRi e IRt) flanqueando al elemento, al que se denominó inicialmente InT7633 por su tamaño (*i.e.* 7.633 pb) (Fig. III.1.1.A). Es de destacar que hasta el momento hay escasos reportes de plataformas portadoras de *bla_{VIM-2}* con módulo *tni* completo en *Pseudomonas* spp. (Juan et al., 2010; Marchiaro et al., 2014a; Zhang et al., 2017b). Algunos autores documentaron plataformas en *Pseudomonas* spp. con entorno compatible con integrones inusuales (Santos et al., 2010; Tada et al., 2017), aunque no ha sido completamente determinada la secuencia de estos EG, por lo que no se conoce si las plataformas de estos integrones/transposones tipo-Tn402 se hallan completa. En este trabajo, se propuso secuenciar las plataformas portadoras de *bla_{VIM-2}* para reconocer en estas estructuras la presencia del módulo de transposición y las IR que bordean a estos EG. La caracterización del InT7633 reveló que en la región variable se encuentran *bla_{VIM-2}* y *aacA4* (codificante de una aminoglucósido acetil transferasa) tal como se evidenció en el integrón In41 de cromosoma de un aislamiento de *P. aeruginosa* resistente a carbapenemes (Lagatolla et al., 2006). El integrón/transposón se halla a su vez inserto en un plásmido auto-transferible (conjugativo) de 38 kpb denominado pLD209, con capacidad de replicar en *E. coli* y *P. aeruginosa* (Marchiaro et al., 2014a). Se reportó asimismo que el sitio de inserción del InT7633 en pLD209 es el gen *tnpA* codificante de una transposasa de un transposón de la familia Tn3. Este evento de transposición generó una nueva plataforma, denominada arbitrariamente Tn9498 por su número de pares de bases, bordeadas por las IR flanqueantes correspondientes al Tn3 (Fig. III.1.10). Es así que aquí se postula que *bla_{VIM-2}* podría diseminarse a través del plásmido, y/o por eventos de

transposición que involucran al InT7633 y/o a la nueva plataforma identificada (Tn9498). La evaluación de estos diferentes eventos genéticos asociados a la movilización de *bla_{VIM-2}* es aquí materia de estudio.

La caracterización molecular de plataformas portadoras de *bla_{VIM-2}* de 12 aislamientos previamente estudiados en nuestro laboratorio mostró que todos son portadores de integrones/transposones tipo-Tn402 con el módulo de transposición completo, aunque diferentes en la región variable (Fig. III.1.1). Entre estos 12 aislamientos, 10 resultaron ser portadores del InT7633 (Tabla III.1.1. y Fig. III.1.1.A). Evidencias de portación plasmídica de *bla_{VIM-2}* en 5 de estos últimos fue observada mediante ensayos de conjugación (Tabla III.1.1), sugiriéndose para el resto de que *bla_{VIM-2}* sería de codificación cromosomal (Tabla III.1.1). Estos estudios previos mostraron asimismo un integrón/transposón tipo-Tn402 relacionado al InT7633, InT7133, en el caso de 2 aislamientos (BA9115 y BA7816, Tabla III.1.1, y Fig. III.1.1.B), el cual posee en la región variable solo *bla_{VIM-2}*. Los ensayos de transferencia de ADN en estos aislamientos mostraron que uno de ellos sería de codificación plasmídica (Tabla III.1.1). La localización cromosómica de los elementos InT7133 e InT7633 en aquellos aislamientos que no evidenciaron portación de *bla_{VIM-2}* en plásmidos, según los ensayos de transferencia de ADN, se evaluarán mediante ensayos de hibridización (*i.e.* “Southern blot”) empleando como sonda *bla_{VIM-2}* (ítem II.3.8, Mats. y Méts.). Los resultados aportarán así evidencias de la funcionalidad del módulo de transposición de integrones/transposones tipo-Tn402 en especies de *P. grupo putida*, y aún entre cepas de la misma especie. De esta manera, se abordará la capacidad potencial de estos EG en diseminar genes de resistencia mediante eventos de transposición desde cromosoma a plásmido (y viceversa). En este contexto, la caracterización molecular de los sitios blancos de transposones identificados en cromosoma, aportará evidencia acerca de los blancos de elección para la transposición; así como de las plataformas involucradas en la transposición, ya sea la estructura bordeada por las IRs del InT7633 o las correspondientes al Tn9498. La caracterización molecular de la plataforma portadora de *bla_{VIM-2}* como así también su localización será asimismo evaluada en un aislamiento clínico de *P. grupo putida* local no caracterizado previamente (HB157, Tabla III.1.1). Por otra parte, se incluirá en similares estudios un aislamiento clínico local de *P. aeruginosa* (HV868) resistente a carbapenemes, portador de *bla_{VIM-2}* en un integrón/transposón tipo-Tn402. La inclusión de esta cepa tiene como objetivo analizar la contribución de los eventos de THG en la diseminación de MβLs como *bla_{VIM-2}* desde bacterias ambientales (*i.e.* *P. grupo putida*) a patógenos oportunistas (*i.e.* *P. aeruginosa*).

El análisis de los resultados en conjunto dará evidencias de la capacidad de *P. grupo putida* de constituir un reservorio de genes de resistencia, bajo el objetivo final de desenmascarar, desde una perspectiva evolutiva, los fenómenos involucrados en la emergencia de resistencia a carbapenemes mediada por MβLs, y su transferencia a patógenos oportunistas nosocomiales. El conocimiento de los mecanismos implicados en estos procesos tendrá un impacto positivo sobre la elección de terapias y prácticas de control de infecciones nosocomiales debidas a cepas multirresistentes (MR) de *P. aeruginosa*.

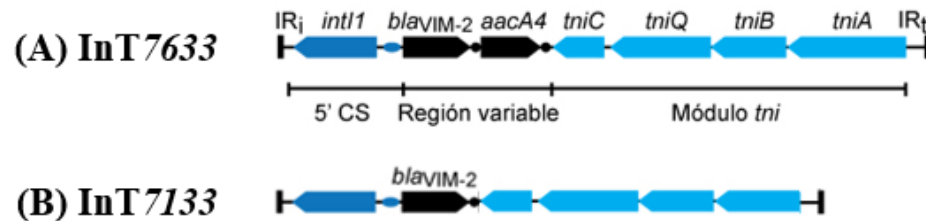


Figura III.1.1. Representación esquemática de integrones clase 1 de aislamientos clínicos de *P. putida*. (A) Estructura del InT7633 en aislamientos evaluados previamente, LD209 (Marchiaro et al., 2014a), LA1008, LA111, HE1012, HP613, HP813, HB313, BA7908, BA9713 y BA9605 (Tabla III.1.1). (B) Estructura del InT7133 en BA7816 y BA9115 (Tabla III.1.1). Gen de la integrasa *intI1* (rectángulo con punta de flecha, azul); *attI1*, sitio de reconocimiento de la integrasa (óvalo azul); *bla_{VIM-2}*, gen codificante de VIM-2 (rectángulo con punta de flecha, negra); *aacA4*, gen codificante de la aminoglucósido acetil transferasa (rectángulo con punta de flecha, negra); *attC*, sitios de reconocimiento de la integrasa (círculos negros). Módulo *tni*: *tniC*, *tniQ*, *tniB*, y *tniA* (rectángulos con puntas de flecha, celestes). *IR_i* e *IR_t*, repeticiones invertidas inicial y terminal, respectivamente, (líneas negras transversales). El sentido de la transcripción de los genes, según las direcciones de los rectángulos con puntas de flecha. Adaptado de Trabajo de Tesis de Doctorado de Marchiaro P. (2012), y Trabajo Final de Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica de Díaz, M. S. (2014)

Este capítulo abordará:

- La caracterización taxonómica de los aislamientos previamente identificados como *P. putida*, empleando marcadores moleculares según esquemas propuestos (Mulet et al, 2013).
- La evaluación de la localización genómica de las diferentes plataformas portadoras de *bla_{VIM-2}*.
- La identificación del sitio de transposición de los transposones tipo-Tn402 de codificación cromosomal, lo que permitirá identificar la estructura genética transponible.
- La evaluación de potenciales mecanismos de diseminación de los EG Tn6335 y Tn6336 entre especies de *P. grupo putida*, y entre éstas con *P. aeruginosa*.

III.1.2. Resultados y Discusión

III.1.2.1. Caracterización taxonómica de aislamientos de *P. grupo putida* portadoras de *bla_{VIM-2}*

Pseudomonas constituye un género de BGN descrito por primera vez en 1894 por Migula y cols., y al presente, se han descrito más de 190 especies (Peix et al., 2017). Este género bacteriano se compone de tres linajes principales, y numerosos grupos y subgrupos definidos en función de análisis filogenéticos de las secuencias concatenadas de ARNr 16S, y de los genes “housekeeping” *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* (Peix et al., 2017). Entre ellos, *rpoD* fue documentado como el marcador más confiable para la discriminación de especies bacterianas en *Pseudomonas* spp., seguido por *gyrB* y *rpoB* (Mulet et al., 2010). Otro método de identificación bacteriana utilizado masivamente en la actualidad para la identificación de microorganismos asociados a procesos infecciosos es la espectrometría de masa MALDI-TOF MS (Mulet et al., 2012). Esta metodología permite la identificación correcta de diferentes especies de *Pseudomonas*, y sus resultados son comparables con los análisis de secuencia de los marcadores mencionados (Mulet et al., 2012; Peix et al., 2017). Sin embargo, esta metodología tiene limitaciones en la identificación de ciertos grupos entre los cuales se incluyen las especies de *P. grupo putida* por presentar perfiles espectrales similares. En este contexto, uno de los objetivos aquí es aportar evidencias de la variabilidad de especies de *P. grupo putida* asociadas a infecciones o colonizaciones en el hombre. Para ello, se caracterizó una colección de 13 aislamientos de *Pseudomonas* spp. productores de VIM-2, identificados inicialmente como *P. putida* por VITEK-2 (Tabla III.1.1) bajo la idea de efectuar una reasignación de especie. Se efectuaron así ensayos de identificación empleando MALDI-TOF MS (MALDI Biotyper, Bruker Daltonik), teniendo presente que la asignación a nivel de especie es confiable solo si los valores que se obtienen son superiores a 2.0 (ítem II.5.1, Mats. y Méts.). Por otra parte, se efectuaron análisis filogenéticos de las secuencias parciales concatenadas del ARNr 16S (1.301 nt), y de los genes *gyrB* (669 nt) y *rpoD* (677 nt) en este orden, acorde a esquemas actuales con modificaciones (Mulet et al., 2013; Peix et al., 2017), bajo propósitos comparativos. Estos últimos incluyeron ensayos de PCR para la amplificación de cada uno de los marcadores (ítem II.3.4.1, Mats. y Méts.), empleando como template muestras de ADN genómico extraído por equipos comerciales (ítem II.3.2, Mats. y Méts.), y los amplicones resultantes enviados a secuenciar (ítem II.6.1, Mats. y Méts.). El análisis filogenético incluyó las secuencias concatenadas correspondientes a las cepas tipo de 18 especies de *P. grupo putida* (ítem III.1.1), 6 cepas de

especies nuevas del grupo propuestas por Mulet y cols. (Mulet et al., 2013), y cepas de referencia de *P. aeruginosa* y *P. oryzihabitans* como especies no relacionadas filogenéticamente. Luego, la totalidad de los concatenados obtenidos fueron utilizados para análisis filogenéticos empleando como método de análisis ML “Maximun Likelihood” (ítem II.5.2, Mats. y Méts.). Las secuencias parciales de los marcadores ARNr 16S, y de los genes *gyrB* y *rpoD* de los aislamientos de este estudio fueron depositados en base de datos del NCBI (Tabla A.1, Anexo).

La clasificación a nivel de especie de los aislamientos en estudio mediante MALDI-TOF MS con la base de datos del sistema en la fecha documentada (ver ítem II.5.1, Mats. y Méts.) mostró que los únicos valores confiables (superiores a 2.0) fueron para los aislamientos BA7908 y BA9115. En ambos casos, la especie asignada fue *P. putida*, coincidentemente a lo evidenciado por VITEK-2 (Tabla III.1.2). Por otro lado, los resultados obtenidos para los aislamientos BA9713, HB157, HP813, LA1008 y HE1012 fueron inferiores a 2.0 siendo *P. putida* la especie más cercana, según la base de datos del equipo. En el caso de los aislamientos LD209, HB313, HP613, BA7816, y LA111, los valores también fueron inferiores a 2.0, y se clasificaron según MALDI-TOF como miembros de *P. grupo putida* (Tabla III.1.2). Por último, el resultado obtenido para BA9605 (menor a 2.0) indicó que este aislamiento es miembro del género *Pseudomonas*, aunque no fue especificado el grupo o especie (Tabla III.1.2). Estos resultados en conjunto revelaron insuficiente resolución a nivel de especie sugiriendo las dificultades del sistema para algunos grupos bacterianos (Bou et al., 2011; Timperio et al., 2017). Ha sido reportado que la adecuación de la base de datos en estos sistemas, empleando cepas adecuadamente tipificadas, aporta claros beneficios (Mulet et al., 2012).

Por otro lado, las secuencias concatenadas de los marcadores empleados en el orden propuesto, de 2.647 pb fueron empleadas para generar el dendrograma correspondiente (ítem II.5.2, Mats. y Méts.). Los criterios seleccionados para la reasignación de especie a cada uno de los aislamientos incluidos en este trabajo corresponden a los propuestos por Mulet y cols. (Mulet et al., 2013), con ligeras modificaciones: i) $\geq 88,3$ % de identidad del concatenado para pertenecer a *P. grupo putida*, el cual constituye el mínimo % observado entre las especies más distantes (*i.e.* los porcentajes de identidad de cualquier miembro de *P. grupo putida* respecto a los observados para *P. aeruginosa* o *P. oryzihabitans* es menor a 88,3); y ii) $\geq 97,5\%$ de identidad del concatenado para pertenecer a alguna especie que conforma al *P. grupo putida*. De esta manera, el análisis de los concatenados de los 13 aislamientos clínicos incluidos en este estudio mostró valores superiores al

88,3% respecto a cualquiera de las 18 cepas tipo, sugiriendo que la totalidad de dichos aislamientos pertenecen a *P. grupo putida* (Tabla III.1.2; Fig. III.1.2).

La identificación a nivel de especie según los criterios planteados permitió asignar 4 de los 13 aislamientos a especies caracterizadas de *P. grupo putida* (Tabla III.1.2; Fig. III.1.2). Así, los aislamientos BA9115 y BA7908 fueron asignados a la especie *P. putida* ($\geq 99,5\%$, Tabla III.1.2; Fig. III.1.2), mientras que los aislamientos HB157 y BA9713 a *P. monteilii* ($\geq 98,6\%$ identidad, Tabla III.1.2; Fig. III.1.2). Por su parte, los restantes 9 aislamientos mostraron valores de identidad inferiores al $\leq 97,5\%$ respecto a cada especie tipo incluida en este análisis, sugiriendo que los mismos corresponderían a especies no caracterizadas aún dentro de *P. grupo putida*. En este sentido, 8 de ellos mostraron porcentajes de identidad superior al 97,5% con las especies nuevas propuestas por Mulet y cols.. (Mulet et al., 2013). Así, LA1008 y HE1012 resultaron pertenecer a *P. grupo putida/II* ($> 99,2\%$, Tabla III.1.2; Fig. III.1.2); LD209, HP613, HB313 y BA7816 a *P. grupo putida/IV* ($> 97,8\%$, Tabla III.1.2; Fig. III.1.2); HP813 como *P. grupo putida/I* (99,05%, Tabla III.1.2; Fig. III.1.2); y BA9605 como *P. grupo putida/V* (98,03%, Tabla III.1.2; Fig. III.1.2). Por último, el aislamiento restante, LA111, no presentó valores superiores al establecido como umbral, respecto a ninguna de las especies mencionadas siendo *P. monteilii* la especie filogenéticamente más cercana (94,86%, Tabla III.1.2; Fig. III.1.2). Este resultado condujo a proponer a LA111 como perteneciente a una nueva especie del grupo, asignada aquí como *P. grupo putida/VII* (Tabla III.1.2; Fig. III.1.2). La diversidad intra-específica se analizó mediante la determinación de los valores de identidad de secuencias concatenadas correspondientes a los aislamientos caracterizados como una misma especie. De esta manera, se obtuvieron valores de identidad del 99,81% entre las dos cepas de *P. putida*; 99,77% entre las dos correspondientes a *P. monteilii*; 99,32% entre las dos correspondientes a *P. grupo putida/II*; y 98,83-100% entre las 4 cepas de *P. grupo putida/IV* (Tabla III.1.2). Estos resultados revelan que la variación genética entre los distintos aislamientos es menor al 1,2% en todos los casos indicando que la asignación de especie por este método es confiable, ya que todos superan el valor de corte propuesto (97,5%). La caracterización genética basada en los marcadores moleculares propuestos (Mulet et al., 2013; Mulet et al., 2017) permitió así identificar todos los aislamientos incluidos en este trabajo.

Los resultados de los análisis filogenéticos mostraron que en la colección local de *P. grupo putida* se cuenta con más de una cepa de la misma especie (Tabla III.1.2; Fig. III.1.2). Esta observación motivó a estudiar la identidad clonal entre los aislamientos de la misma especie. La

metodología de OD-PCR (ítem II.3.4.2, Mats. y Méts.) empleada como técnica genotípica (Limansky y Viale, 2002), mostró perfiles de amplificación diferentes para los dos aislamientos correspondientes a *P. putida* (BA9115; BA7908), así como para los dos aislamientos de *P. monteilii* (HB157, BA9713), y para ambos aislamientos de *P. grupo putida/II* (LA1008, HE1012) (Fig. III.1.3; Tabla III.1.2). Estos resultados mostraron en cada una de dichas especies, dos clones denominados Pp_A y Pp_B para *P. putida*; Pm_A y Pm_B para *P. monteilii* y, PpGII_A y PpGII_B para *P. grupo putida/II* (Tabla III.1.2). En el caso de los 4 aislamientos de la especie *P. grupo putida/IV* se identificaron por OD-PCR dos perfiles de amplificación, denotando así dos clones, clon Pgp4_A (BA7816) y clon Pgp4_B (LD209 y HP613, correspondientes al mismo hospital, R3; y HB313 a un hospital diferente, R4) (Fig. III.1.3; Tabla III.1.1). Este último resultado muestra la diseminación del clon Pgp4_B en 2 hospitales de Rosario, sugiriendo eventos de diseminación inter-hospitalaria de dicho clon durante 2013 (Fig. III.1.3; Tablas III.1.1 y III.1.2). Asimismo, se evidencia la presencia de la misma cepa, LD209 y HP613, en 2009 y 2013, respectivamente; lo que sugiere persistencia de dicho clon en el hospital. La diversidad de especies pertenecientes a *P. grupo putida* portadoras de *bla*_{VIM-2} identificadas en diferentes hospitales locales y de una región distante del país (Buenos Aires) sugiere que este grupo bacteriano sería reservorio de este gen de resistencia, y que su transmisión estaría mediada por diversos eventos de THG.

Finalmente, estos resultados en conjunto revelan la existencia de numerosas especies no caracterizadas al presente como portadoras de *bla*_{VIM-2}. El análisis filogenético constituye una metodología eficiente para la asignación de especie, siendo necesaria la actualización de la base de datos del MALDI-TOF, esencialmente para algunos grupos bacterianos (Bou et al. 2011; Mulet et al., 2012; Timperio et al., 2017). Es de destacar que la cepa LD209 asignada previamente como *P. putida* (Marchiaro et al., 2014a) fue re-clasificada aquí como *P. grupo putida/IV*. Por último, los análisis efectuados sugieren que existen distintas especies de *P. grupo putida* capaces de asociarse a infecciones hospitalarias y además, *bla*_{VIM-2} se diseminaría entre sus miembros. En definitiva, estos resultados revelan así que las especies de *P. grupo putida*, serían reservorio de *bla*_{VIM-2} y señalan el profuso intercambio de este gen de resistencia entre sus miembros.

Tabla III.1.1. Características de los aislamientos clínicos de *Pseudomonas* spp. productores de VIM-2

Aislamiento ^a	Origen/ Hospital/ Fecha	Fuente de aislamiento	CIM (µg/ml) ^c								InT ^d	Plásmido conjugativo portador de <i>bla</i> _{VIM-2} ^e	Integrón ^f	Transpo són ^g
			IPM	MEM	CAZ	FEP	PTZ	GEN	AMK	CIP				
BA7908	Bs. As./B1/2006	LCR ^h	≥ 16	≥ 16	16	4	32	1	≤ 2	≤ 0,25	InT7633		In41	Tn6335
BA9115	Bs. As./B2/2006	Sangre	≥ 16	≥ 16	32	16	64	8	≤ 2	≥ 4	InT7133	-	In899	Tn6336
BA9713	Bs. As./B3/2008	Sangre	≥ 16	≥ 16	16	2	32	8	≤ 2	≤ 0,25	InT7633	-	In41	Tn6335
HB157 ^b	Rosario/R4/2014	Sangre	≥ 16	≥ 16	16	16	32	8	≤ 2	≥ 4	-	-	In528	-
HP813	Rosario/R3/2013	Orina	≥ 16	≥ 16	≥ 64	16	≥ 128	≥ 16	≤ 2	≥ 4	InT7633	-	In41	Tn6335
LA1008	Rosario/R1/2008	Orina	≥ 16	≥ 16	≥ 64	16	64	≥ 16	4	≥ 4	InT7633	-	In41	Tn6335
HE1012	Rosario/R2/2012	Sangre	≥ 16	≥ 16	32	16	≥ 128	≥ 16	≥ 64	≥ 4	InT7633	+	In41	Tn6335
HB313	Rosario/R4/2013	LP ^h	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 64	≥ 128	≥ 16	16	1	InT7633	+	In41	Tn6335
LD209	Rosario/R3/2009	LBA ^h	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 64	64	≥ 16	4	≥ 4	InT7633	+	In41	Tn6335
HP613	Rosario/R3/2013	Endocervix	≥ 16	≥ 16	≥ 64	16	≥ 128	≥ 16	≤ 2	≥ 4	InT7633	-	In41	Tn6335
BA7816	Bs. As./B2/2006	Orina	≥ 16	≥ 16	≥ 64	16	≥ 128	≥ 16	≤ 2	≥ 4	InT7133	+	In899	Tn6336
BA9605	Bs. As./B3/2007	Sangre	≥ 16	≥ 16	≥ 64	8	≥ 128	≥ 16	≤ 2	≥ 4	InT7633	+	In41	Tn6335
LA111	Rosario/R1/2011	Sangre	≥ 16	≥ 16	≥ 64	16	≥ 128	≥ 16	≤ 2	≥ 4	InT7633	+	In41	Tn6335
HV868 ^b	Rosario/R5/2011	Espuito	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 64	≥ 128	8	≥ 64	1	InT7633	+	In41	Tn6335

^aBA corresponde a cepas clínicas del Servicio de Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS “Dr. Carlos G Malbrán”, Buenos Aires y las restantes son cepas recuperadas en diferentes hospitales de Rosario y alrededores.

^bAislamientos incluidos en el transcurso de este Trabajo de Tesis.

^cConcentración Inhibitoria Mínima. IPM, imipenem; MEM, meropenem; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; PTZ, piperacillin-tazobactama; GEN, gentamicina; AMK, amikacina; CIP, ciprofloxacina.

^dDenominación de trabajos previos (Trabajo de Tesis de Marchiaro P., y Trabajo de Especialización de Díaz, María S.).

^eLa presencia de *bla*_{VIM-2} en plásmidos conjugativos se determinó previamente para todas las cepas (excepto para HB157 y HV868) mediante conjugación empleando comoceptoras *E. coli* DH5α Rif^R o *P. aeruginosa* PAO1 Rif^R, y para el segundo pasaje *E. coli* MC4100 Cmp^R.

^fDenominación de los integrones según INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>).

^gDenominación de los transposones según Tn Number Registry (<http://transposon.lstmed.ac.uk/>).

^hLíquido cefalorraquídeo, LCR; líquido peritoneal, LP; y lavado bronco-alveolar, LBA.

Tabla III.1.2. Asignación de especie en los aislamientos de *P. grupo putida* caracterizados en este trabajo.

Aislamiento	Identificación según VITEK-2 C	Identificación según MALDI-TOF MS ^a	% de identidad con la cepa tipo más cercana ^b	% de identidad con la especie nueva más cercana ^c	Asignación de especie ^d	Diversidad intra-especie ^e	Clon ^f
BA9115	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	99,58 (<i>P. putida</i>)	-	<i>P. putida</i>	99,81%	Pp _A
BA7908	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	99,62 (<i>P. putida</i>)	-	<i>P. putida</i>		Pp _B
BA9713	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	98,94 (<i>P. monteilii</i>)	-	<i>P. monteilii</i>	99,77%	Pm _A
HB157	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	98,79 (<i>P. monteilii</i>)	-	<i>P. monteilii</i>		Pm _B
HP813	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	96,86 (<i>P. monteilii</i>)	99,05 (<i>P. grupo putida</i> /I)	<i>P. grupo putida</i> /I	-	PgpI
HE1012	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	96,75 (<i>P. monteilii</i>)	99,28 (<i>P. grupo putida</i> /II)	<i>P. grupo putida</i> /II	99,32%	PpGII _A
LA1008	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	97,19 (<i>P. monteilii</i>)	99,81 (<i>P. grupo putida</i> /II)	<i>P. grupo putida</i> /II		PpGII _B
BA7816	<i>P. putida</i>	<i>P. grupo putida</i>	96,07 (<i>P. monteilii</i>)	97,88 (<i>P. grupo putida</i> /IV)	<i>P. grupo putida</i> /IV	98,83-100%	PpGIV _A
LD209	<i>P. putida</i>	<i>P. grupo putida</i>	96,48 (<i>P. monteilii</i>)	98,14 (<i>P. grupo putida</i> /IV)	<i>P. grupo putida</i> /IV		PpGIV _B
HP613	<i>P. putida</i>	<i>P. grupo putida</i>	96,41 (<i>P. monteilii</i>)	98,08 (<i>P. grupo putida</i> /IV)	<i>P. grupo putida</i> /IV		PpGIV _B
HB313	<i>P. putida</i>	<i>P. grupo putida</i>	96,48 (<i>P. monteilii</i>)	98,14 (<i>P. grupo putida</i> /IV)	<i>P. grupo putida</i> /IV		PpGIV _B
BA9605	<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	93,76 (<i>P. plecoglossicida</i>)	98,03 (<i>P. grupo putida</i> /V)	<i>P. grupo putida</i> /V	-	PpGV
LA111	<i>P. putida</i>	<i>P. grupo putida</i>	94,86 (<i>P. monteilii</i>)	-	<i>P. grupo putida</i> /VII	-	PpGVII

^aIdentificación empleando MALDI-TOF MS (IVD, MALDI Biotyper 2.2, Bruker Daltonik).

^{b,c}El porcentaje de identidad se basa en la comparación de las secuencias concatenadas de las secuencias parciales de ARNr 16S, *gyrB* y *rpoD* respecto a la cepa tipo mas cercana^c, o a las especies nuevas propuestas (I, II, IV or V, Mulet et al., 2013)^d.

^dLa asignación de especie se basa en la comparación del porcentaje de identidad (%) del concatenado correspondiente a las cepas bajo estudio respecto al concatenado de especies tipo, y de nuevas especies propuestas (Mulet et al., 2013), siendo el valor de corte $\geq 97,5\%$ para pertenecer a alguna especie de *P. grupo putida*.

^eLa diversidad intra-específica es el valor obtenido según la comparación de los concatenados obtenidos para distintas cepas de la misma especie.

^fLa identidad clonal fue determinada mediante OD-PCR (Limansky y Viale, 2002).

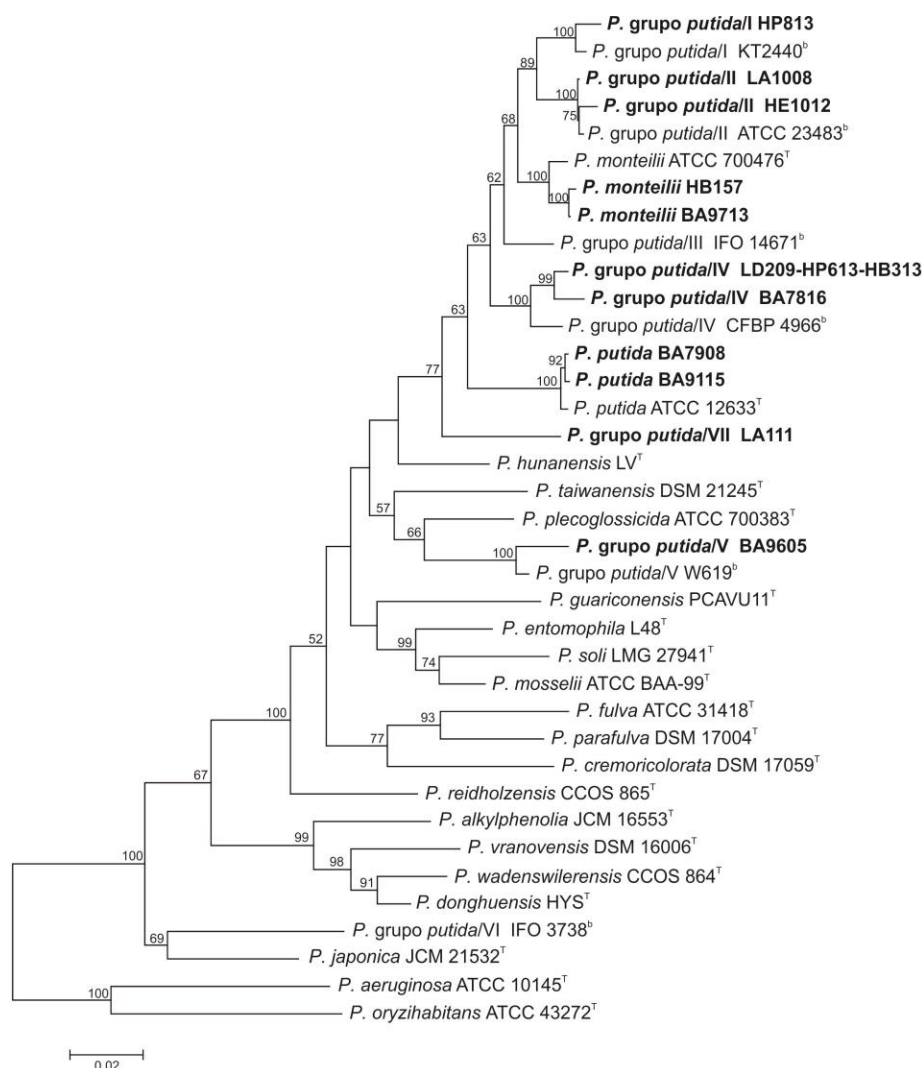


Figura III.1.2. Árbol filogenético basado en secuencias nucleotídicas concatenadas de secuencias parciales del ARNr 16S, *gyrB* y *rpoD*. El dendrograma se obtuvo empleando ML ("Maximum Likelihood"). Los porcentajes de "bootstrap" obtenidos de 1000 réplicas se indican en los nodos de las ramas. Cepas de este trabajo: en negrita; ^bCepas propuestas como nuevas especies de *P. grupo putida* (Mulet et al., 2013); ^TCepas tipo de *P. grupo putida*.

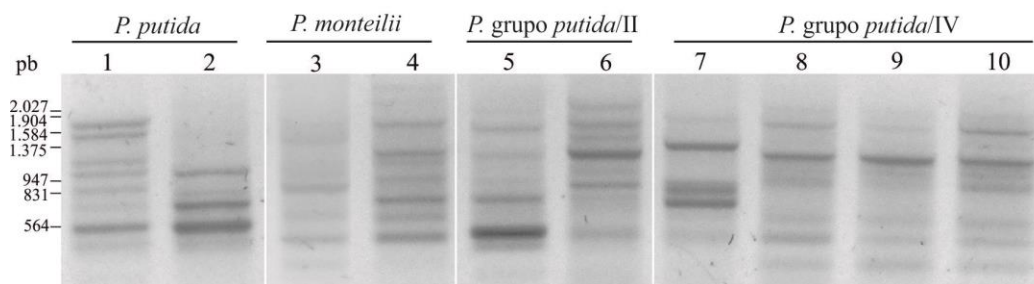


Figura III.1.3. Perfiles de amplificación correspondientes a aislamientos de *P. grupo putida* de nuestra colección mediante OD-PCR/19. Líneas verticales blancas separan calles correspondientes a los clones de distintas especies. Calles 1 y 2, *P. putida* BA9115 (clon Pp_A) y BA7908 (clon Pp_B), respectivamente; calles 3 y 4, *P. monteirii* HB157 (clon Pm_B) y BA9713 (clon Pm_A), respectivamente; calles 5 y 6, *P. grupo putida/II* LA1008 (clon PpGII_B) y HE1012 (clon PpGII_A), respectivamente; y calles 7-10 *P. grupo putida/IV* BA7816 (clon PpGIV_A), LD209-HP613-HB313 (clon PpGIV_B), respectivamente. A la izquierda, marcador de tamaño molecular (pb), ADN λ digerido con *EcoRI* y *HindIII*.

III.1.2.2. Plataformas portadoras de *bla*_{VIM-2} en aislamientos clínicos locales de *P. grupo putida*: caracterización molecular y eventos involucrados en su diseminación

La mayoría de los genes codificantes de MβLs están asociados a integrones de clase 1 (Poirel et al., 2006, Zhao y Hu, 2015). Estos a su vez, están insertos en plataformas genéticas móviles como transposones y/o plásmidos los cuales permiten la diseminación de los mismos entre bacterias (Poirel et al., 2006, Partridge, 2018). En este contexto, estudios previos realizados en el laboratorio en 12 aislamientos de *P. grupo putida* (caracterizados a nivel de especie en este trabajo de tesis, ítem III.1.2.1) productores de VIM-2 revelaron que la plataforma portadora del gen codificante de este determinante de resistencia está constituida por integrones/transposones tipo-Tn402 (denominados InT7633 e InT7133) con módulos de transposición completos (III.1.1.2.; Tabla III.1.1). La recuperación de un nuevo aislamiento clínico local, HB157, identificado en este trabajo como *P. monteilii* (Tabla III.1.2) productor de VIM-2 motivó su inclusión a la colección de cepas de estudio para proceder a la caracterización molecular de su plataforma como así también su localización genética. En este contexto, la caracterización sistemática de plataformas genéticas (*e.g.* integrones, transposones, y/o plásmidos) involucradas en la diseminación de *bla*_{VIM-2}, siendo VIM-2 la segunda MβL más diseminada en el escenario clínico, podrá dar cuenta de mecanismos involucrados en la transferencia de este gen de resistencia desde microorganismos ambientales que actúan como reservorio (*e.g.* *P. grupo putida*) a patógenos como *P. aeruginosa* y enterobacterias.

III.1.2.2.1. Caracterización de integrones/transposones InT7633 e InT7133. Nomenclatura internacional

La descripción de integrones/transposones tipo-Tn402 con módulo *tni* completo e IRs flanqueantes, es al presente escasa. Esto ha reforzado la hipótesis del modelo evolutivo que sustenta que los mismos serían ancestrales, y que han evolucionado hacia estructuras incapaces de transposición autónoma (Stokes et al., 2006; Post et al., 2007; Samuelsen et al., 2009; Juan et al., 2010; Betteridge et al., 2011; Gillings, 2014). Estudios preliminares del laboratorio dieron cuenta de la presencia prevalente del integrón In41, portador de *bla*_{VIM-2} y *aacA4* en la región variable, incluido en un elemento genético caracterizado en su totalidad como integrón/transposón InT7633 (denominado así por su número de nt totales). Este EG ha sido detectado en 10 cepas de la colección bajo estudio (Tabla III.1.1), pertenecientes a diferentes especies de *P. grupo putida*; entre ellas *P. putida*, *P. monteilii*, *P. grupo putida*/I, *P. grupo putida*/II, *P. grupo putida*/IV, *P. grupo putida*/V,

P. grupo putida/VII. Por otra parte, un integrón/transposón similar a InT7633, InT7133 (por su número de pb), portador sólo de *bla_{VIM-2}* en la región variable ha sido identificado en 2 cepas correspondientes a las especies *P. putida* y *P. grupo putida*/IV (Tabla III.1.1). No obstante, no había sido caracterizado hasta el momento el integrón incluido en el InT7133. En este contexto, ha sido de interés caracterizar el integrón incluido en este elemento genético de acuerdo a la base de integrones de INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>; Moura et al., 2009), como así también designar a los integrones/transposones de acuerdo al esquema actual propuesto (Roberts et al., 2008). Para ello, por un lado se realizaron análisis comparativos de la secuencia nucleotídica del InT7133 contra bases de datos de INTEGRALL y por otro lado, se caracterizaron ambos integrones/transposones, InT7633 e InT7133, de acuerdo a las pautas establecidas en el sitio “Tn Number Registry” (<https://transposon.lstmed.ac.uk/tn-registry>; Roberts et al., 2008).

El resultado de los análisis comparativos del InT7133 evidenció que la estructura compuesta por *bla_{VIM-2}-tniC* exhibió 99% de identidad contra el In899, depositado en base de datos del INTEGRALL y del NCBI (KJ668595), de la cepa clínica de *P. chlororaphis*, aislada de un paciente hospitalizado en la ciudad de Mendoza (Faccone et al., 2014). En este reporte, se describió una estructura de 1.118 pb compuesta de *bla_{VIM-2}* y la región parcial de *tniC*, ubicada corriente abajo. Si la cepa de *P. chlororaphis* posee el InT7133 completo sería motivo de posteriores análisis. El conjunto de estas observaciones muestra que el In899 se encuentra incluido en la estructura genética aquí caracterizada como InT7133 (Fig. III.1.4), presente en las cepas *P. putida* BA9115 y *P. grupo putida*/IV BA7816 (Tablas III.1.1 y III.1.2), como así también en *P. chlororaphis* (Faccone et al., 2014). Estos resultados en conjunto muestran que integrones, con extremo 3' inusuales, se hallan diseminados en especies diferentes del género *Pseudomonas*, y a su vez en diferentes regiones de nuestro país. Los mecanismos de diseminación de estos integrones son aquí materia de estudio.

Por su parte, la nomenclatura internacional actual para transposones requiere que aquellos elementos que poseen la potencialidad de movilizarse como EGM sean incluidos en el registro internacional de transposones (“Tn Number Registry”). En este sentido, InT7633 e InT7133 cumplen con los requisitos mencionados, dado que presentan la maquinaria de transposición completa así como las repeticiones invertidas (Fig. III.1.4). Fueron re-denominados aquí como Tn6335 y Tn6336 (Fig. III.1.4; Tabla III.1.1), respectivamente, según <https://transposon.lstmed.ac.uk/tn-registry>. Por último, el análisis comparativo del Tn6336 contra

el Tn6335 reveló una identidad nucleotídica del 99% siendo la única diferencia la carencia del gen *aacA4* en el primer caso, lo cual evidencia que ambos transposones están estrechamente relacionados.

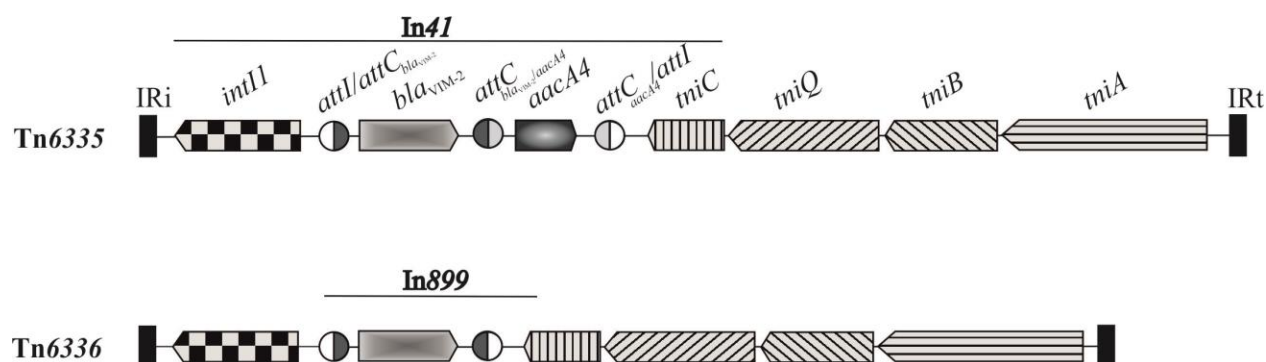


Figura III.1.4. Representación esquemática de la organización genética de los transposones Tn6335 (previamente denominado InT7633) y Tn6336 (previamente, InT7133). Las regiones correspondientes a los integrones In41 e In899 están indicadas en la parte superior de cada estructura. Gen de la integrasa *intI1*: rectángulo con punta de flecha, cuadriculado; *attI*, sitio de reconocimiento de la integrasa: medio círculo blanco, corriente abajo de *intI1*, y corriente arriba de *tniC*; *bla_{VIM-2}*, gen codificante de VIM-2: rectángulo con punta de flecha, gradiente de gris claro; *aacA4*, gen codificante de la aminoglucósido acetil transferasa: rectángulo con punta de flecha, gradiente de negro; *attC_{blaVIM-2}*, sitio de recombinación del casete de *bla_{VIM-2}*: medio círculo negro, corriente arriba y abajo de *bla_{VIM-2}*; *attC_{aacA4}*, sitio de recombinación del casete de *aacA4*: medio círculo gris, corriente arriba y abajo de *aacA4*. Módulo *tmi* (*tmiC*, *tmiQ*, *tmiB*, y *tmiA*): rectángulos con puntas de flecha, gris claro con líneas negras. IRi e IRt, repeticiones invertidas inicial y terminal, respectivamente, rectángulos negros transversales. El sentido de la transcripción de los genes, según las direcciones de los rectángulos con puntas de flecha. Las regiones de recombinación están basadas en Gillings y cols. (Gillings et al., 2014).

III.1.2.2.2. Caracterización de la plataforma portadora de *bla_{VIM-2}* en *P. monteilii* HB157

La MβL adquirida *bla_{VIM-2}* en *Pseudomonas* spp. se halla esencialmente asociada a integrones/transposones insertos en cromosomas, aunque también han sido detectados en plásmidos de amplio rango de hospedador, facilitando así la diseminación de VIM-2 a nivel mundial (Zhao y Hu, 2011b; Zhao y Hu, 2015; Hong et al., 2015). Aun cuando se ha reportado frecuentemente la portación de *bla_{VIM-2}* en *P. aeruginosa*, escasos estudios han sido realizados en especies ambientales del género *Pseudomonas*, e.g. *P. monteilii* de *P. grupo putida* (Ocampo-Sosa et al., 2015). En este contexto, parte de los objetivos específicos ha sido caracterizar el entorno genético del gen *bla_{VIM-2}* así como la localización genómica de la plataforma involucrada en el aislamiento clínico *P. monteilii* HB157. Esto permitirá evaluar las estructuras genéticas asociadas al gen de resistencia en *Pseudomonas* spp., así como proveer evidencias de los eventos genéticos involucrados en su diseminación.

III.1.2.2.2.1. Caracterización de la cepa clínica *P. monteilii* HB157 productora de VIM-2

P. monteilii es un BNF perteneciente a *P. grupo putida* con capacidad de colonizar diferentes nichos incluyendo suelo, agua, y seres vivos (Scotta et al., 2011; Ma et al., 2012; Mulet et al., 2013). Infecciones causadas por *P. monteilii* son infrecuentes, y las cepas asociadas generalmente son susceptibles a la mayoría de los antibióticos. Sin embargo, en los últimos años se reportaron cepas de *P. monteilii* resistentes a carbapenemes debido a la expresión de MβLs incluyendo IMP-13 (Bogaerts et al., 2011), VIM-2 (Scotta et al., 2011; Ocampo-Sosa et al., 2015), y VIM-13 (Scotta et al., 2011). En este contexto, algunos autores han hipotetizado que BGN ambientales, entre ellos especies del *P. grupo putida* (e.g. *P. putida* y *P. monteilii*) constituirían reservorios ambientales de genes de MβLs (Almuzara et al., 2007; Santos et al., 2010; Scotta et al., 2011; Ocampo-Sosa et al., 2015). En este contexto, se evaluó el aislamiento clínico HB157 identificado en este trabajo como *P. monteilii* (ítem III.1.2.1; Tabla III.1.2) productor de MβL, según ensayos fenotípicos y moleculares (ítem II.2.2, Mats. y Méts.). Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana mediante VITEK-2 mostraron valores de CIMs correspondientes a la categoría de resistente para imipenem (≥ 16 µg/ml), meropenem (≥ 16 µg/ml), ceftazidima (16 µg/ml), cefepime (16 µg/ml) y ciprofloxacina (≥ 4 µg/ml); valores intermedios para piperacilina/tazobactama (32 µg/ml); y valores de categoría sensible para ampicacina (≤ 2 µg/ml) y gentamicina (8 µg/ml) según CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2018) (Tabla III.1.1). A fin de determinar su mecanismo de resistencia a carbapenemes se realizaron PCRs para la detección de genes codificantes de MβL prevalentes, incluyendo las familias *blavim*, *blaIMP*, *blasPM* y *blaNDM*, empleando como templado ADN genómico (ítem II.3.2, Mats. y Méts.), y posterior secuenciación (ítem II.6.1). Los resultados de estos ensayos revelaron que *P. monteilii* HB157 es portadora de *blavim-2*. Aislamientos clínicos de esta especie, portadores de *blavim-2*, han sido recientemente reportados en España (Ocampo-Sosa et al., 2015). En este contexto, es interesante destacar que en la colección de cepas del laboratorio se identificó otro aislamiento de la misma especie, *P. monteilii* BA9713, portadora de *blavim-2* inserto en el Tn6335, EGM prevalente en nuestra región, según estudios previos (Tabla III.1.1). No obstante, *P. monteilii* BA9713 no muestra identidad clonal con *P. monteilii* HB157, según los perfiles de amplificación obtenidos al emplear OD-PCR (ítem III.1.2.1; Fig. III.1.3). De esta manera, *P. monteilii* BA9713 y HB157 son las primeras cepas de esta especie del *P. grupo putida* portadoras de *blavim-2* reportadas al presente en Argentina y en América.

III.1.2.2.2. Caracterización de la plataforma genética portadora de *bla*_{VIM-2} en HB157

Las plataformas portadoras de *bla*_{VIM-2} presentes en la colección de cepas de *P. grupo putida* incluyen los Tn6335 y Tn6336, siendo el primero de ellos la estructura prevalente (Tabla III.1.1). Dichos transposones se hallan localizados en plásmidos conjugativos o en cromosoma, según evidencias derivadas de ensayos de transferencia de ADN realizados previamente en el laboratorio (Tabla III.1.1). Entre ellas, *P. monteilii* BA9713, aislada de un hospital de Buenos Aires en 2008, presentaría el Tn6335 localizado en cromosoma según resultados de los ensayos de conjugación (Tabla III.1.1). En este contexto, se evaluó el entorno genético de *bla*_{VIM-2} en la cepa *P. monteilii* HB157. Para ello, se utilizó la metodología de cartografía por PCR usando combinaciones de cebadores específicos seguido de “primer walking” o caminata con cebadores (Tablas II.1 y II.2, Mats. y Méts.) empleando como templado muestras de ADN genómico extraído mediante equipos comerciales (ítem II.3.2, Mats. y Méts.). Así, la determinación de la región corriente arriba de *bla*_{VIM-2} se llevó a cabo empleando una combinación de cebadores específicos de la repetición invertida del Tn402 (IR-HP) y del gen *bla*_{VIM} (VIM-R) (Tablas II.1 y II.2, Mats. y Méts.). Por otro lado, para determinar la probable presencia del extremo 3' inusual homólogo al prevalente en otros aislamientos del *P. grupo putida* de la colección local, se empleó el cebador VIM-D en combinación con el cebador específico de *tniC* (TniC-R2) (Tablas II.1 y II.2, Mats. y Méts.). Asimismo, a fin de identificar la presencia de los genes restantes del módulo de transposición (*i.e.* *tniQ*, *tniB*, y *tniA*); de la IRT; como así también de los genes adyacentes al módulo se emplearon por un lado, diferentes combinaciones de cebadores incluyendo VIM-D/TniB-R; TniC-D/TniB-R; TniB-D/TniA-R; y TniB-D/IR-HP siguiendo la estrategia previamente empleada por Marchiaro y cols. (Tablas II.1 y II.2, Mats. y Méts; Marchiaro et al., 2010), y por otro lado, ensayos de PCR inversa (Ochman et al., 1988; ítem II.3.4.3, Mats. y Méts.). Por último, la evaluación de la localización de *bla*_{VIM-2} se efectuó empleando diferentes ensayos de transferencia de ADN (ítem II.4.1, Mats. y Mets).

La caracterización de la región corriente arriba de *bla*_{VIM-2} mediante PCR usando IR-HP y VIM-R reveló la presencia de un amplicón de 3.233 pb que incluyó la presencia de los siguientes elementos genéticos (en orden 5'a 3'): la IRI, el gen *intI1*, así como los genes *dhfrB1* (gen codificante de dihidrofolato reductasa vinculada a la resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol), *aacA4* y *bla*_{VIM-2} en la región variable (Fig. III.1.5). La caracterización de la región corriente abajo de *bla*_{VIM-2} fue efectuada mediante PCR empleando la combinación de los cebadores VIM-D/TniC-

R2, lo cual reveló la presencia del gen *tniC* completo, (Fig. III.1.5), el cual exhibió 99% de identidad nucleotídica con el homólogo correspondiente de Tn6335 y Tn6336. Así, estos resultados muestran que *blav_{VIM-2}* ha sido el primer gen incorporado a la región variable del integrón, seguido por *aacA4*, y más recientemente *dhfRB1*. La secuencia nucleotídica que incluye *IntI1-dhfRB1-aacA4-blav_{VIM-2}-tniC* resultó ser 100% idéntica a la del integrón In528 de la cepa *P. aeruginosa* R22 depositada en la base de datos de INTEGRALL y del NCBI (AM993098.1). El hallazgo del integrón In528 en la colección local de aislamientos de *P. grupo putida* (Tabla III.1.1) mostró la diversidad de integrones clase 1 presentes en este grupo bacteriano. Aun así, restaba conocer la presencia de la maquinaria de transposición completa en esta cepa. Para ello, fueron efectuados ensayos de PCR empleando las combinaciones de cebadores TniC-D/TniB-R; TniB-D/TniA-R; y TniB-D/IR-HP, siguiendo la estrategia planteada por Marchiaro y cols. (Fig. III.1.5; Marchiaro et al., 2010). Los amplicones obtenidos, y secuenciados, evidenciaron la presencia de los genes *tniQ*, *tniB* y *tniA* así como la IRt. Sin embargo, ensayos de PCR empleando la combinación VIM-D/TniB-R que amplifica la región que comprende *blav_{VIM-2}-tniC-tniQ-tniB* (Fig. III.1.5), realizados por triplicado, no permitieron obtener amplicones; aun cuando los controles empleados, cepa LD209 portadora del Tn6335 (Tabla III.1.1; Marchiaro et al., 2010) y cepa BA7816 portadora del Tn6336 (Tabla III.1.1), mostraron los fragmentos esperados de 3.754 pb y 3.118 pb. Estos resultados sugirieron que el módulo *tni* estaría probablemente interrumpido. El análisis comparativo de las secuencias de *tniQ*, *tniB*, *tniA*, y la región que incluye a la IRt obtenidas para la cepa HB157, con los homólogos correspondientes de los transposones Tn6335 y Tn6336 (quienes presentan 99% de identidad entre sí) revelaron sorprendentemente bajas identidades nucleotídicas (*i.e.* 84%, 85%, 86%, y 92%, respectivamente). En contraposición, la comparación de secuencias nucleotídicas de los homólogos del gen *tniC*, de HB157 respecto de los presentes en los Tn, mostraron alta identidad nucleotídica (99%). Esta observación sumada a la falla en el ensayo de PCR al emplear VIM-D/TniB-R aportaron evidencias de que el gen *tniC*, adyacente a *blav_{VIM-2}*, no estaría contiguo a los genes *tniQ*, *tniB* y *tniA*. Alternativamente, estos últimos genes podrían corresponder a otro transposón de la familia Tn402 presente en el genoma de HB157. Para dilucidar estas alternativas, se evaluó la región que comprende *tniQ-tniB-tniA-IRt* contra la base de datos del NCBI (GenBank) mediante BlastN. El resultado de este análisis mostró que esta región tiene homología (98% de identidad) con el módulo *tni* del Tn512 (integrón/transposón tipo-Tn402) localizado en el plásmido pHN39-SIM (KU254577.1) de la cepa clínica de *P. aeruginosa* HN39. Es de destacar que el módulo *tni* de pHN39-SIM se encuentra corriente abajo de los genes

involucrados en la resistencia a mercurio (operón *mer*), y no asociado a genes codificante de MβLs. Además, el gen *tniC* corriente abajo de *bla_{VIM-2}* presente en HB157 presenta 84% de identidad nucleotídica con el homólogo de pHN39-SIM. Estos resultados sugieren que en HB157 se hallarían dos módulos *tni* incompletos, el primero, asociado a *bla_{VIM-2}*, en el cual solo estaría presente *tniC* del módulo de transposición; y un segundo módulo en el cual fueron hallados los genes *tniQ*, *tniB*, *tniA* así como la IRt, los cuales estarían asociados al operón *mer*, tal como fue evidenciado en pHN39-SIM.

Bajo el objetivo de confirmar la hipótesis de que *tniC* no está contiguo al resto de los genes del módulo *tni* se realizaron ensayos de PCR inversa (Ochman et al., 1988). Brevemente, el ADN genómico de HB157 fue digerido con la enzima *EcoRI*, la cual no digiere dentro de la estructura IRI-*intII-dhfrB-aacA4-bla_{VIM-2}-tniC*, y luego fue sometido a ligación empleando la ADN ligasa (ítem II.3.4.3, Mats. y Méts.). De esta manera, se generan numerosas moléculas de ADN de conformación circular entre las que se hallaría incluida aquella que contiene la estructura de interés. Por último, ensayos de PCR convencional utilizando cebadores diseñados de manera invertida de los cebadores VIM-R (VIM-Rd) e IR-HP (IR-HP_r) lograrían amplificar la región aledaña a *tniC* (Fig. III.1.5; ítem II.3.4.1, Mats. y Méts.). Los resultados de este ensayo permitieron obtener un amplicón de alrededor 4,5 kpb el cual fue enviado a secuenciar. El análisis de la secuencia obtenida con el cebador VIM-Rd (Tabla II.1) reveló que corriente abajo de *tniC* se encuentra presente la secuencia de inserción IS6100 (parcial, Fig. III.1.5) confirmando la hipótesis que la estructura IRI-*intII-dhfrB-aacA4-bla_{VIM-2}-tniC* no se encuentra adyacente al resto del módulo *tni* observado en HB157. El elemento IS6100 de 880 pb, integrado por un gen codificante de transposasa, y sus IR flanqueantes, fue reportado por primera vez en *Mycobacterium fortuitum* (Guilhot et al., 1994), y luego ha sido identificado en numerosos géneros bacterianos incluyendo *Xanthomonas*, *Arthrobacter* y *Pseudomonas* (base de datos del ISfinder, isfinder.biotoul.fr). El hallazgo de IS6100 inserto en otras plataformas genéticas de disseminación de genes de resistencia ha sido reportado (Hall et al., 1994; Partridge et al., 2018). Estudios comparativos de la estructura hallada en HB157, i.e. IRI-*intII-dhfrB-aacA4-bla_{VIM-2}-tniC*-IS6100, contra bases de datos del NCBI (GenBank) mostraron que la cepa *P. putida* PP112420 (CP017073.1) presenta una estructura homóloga a la identificada en *P. monteilii* HB157 exhibiendo un 99% de identidad nucleotídica. Es de destacar que en *P. putida* PP112420 la estructura se encuentra localizada en cromosoma y contiene los genes *apha3* y *apha6*, cuyos productos proteicos están vinculados a la resistencia a aminoglucósidos, corriente abajo de IS6100. Restaría aun determinar el entorno genético inmediato a la IS6100 bajo

la idea de confirmar la probable presencia de *apha3* y *apha6* en HB157 (en caso que haya similitud con la estructura genética de *P. putida*), y/o evaluar la restante plataforma genética corriente abajo de IS6100 con el objetivo de determinar la estructura portadora de *bla*_{VIM-2} en *P. monteilii*. La posibilidad de que *tniC* haya originalmente conformado un módulo híbrido con *tniQ-tniB-tniA*, sometido luego a diferentes eventos genéticos (*e.g.* inserción de IS6100), no fue descartada preliminarmente dado que eventos de recombinación en los sitios *res* de transposones tipo-Tn402 constituyen eventos probables (Labbate et al., 2008). En este sentido, ha sido detectado el transposón Tn6007 en una cepa de *E. cloacae* aislada de materia fecal humana, el cual posee un módulo *tni* híbrido derivado de dos transposones no homólogos tipo-Tn402 (Labbate et al., 2008). En el caso HB157, la posibilidad de un módulo híbrido original basado en la observación inicial de que *tniC* posee elevada identidad nucleotídica (99%) cuando se comparan con los respectivos homólogos del Tn402 (Radström et al., 1994), mientras que el resto del módulo (*tniQ-tniB-tniA-IRt*) posee identidad inferior (89%), ha podido descartarse luego por el hallazgo de una secuencia parcial de *tniC* corriente arriba de *tniQ-tniB-tniA-IRt* empleando el cebador homólogo al extremo 3' de *tniC* (TniC-D) en combinación con el cebador de *tniB* (TniB-R) (Fig. III.1.5).

Bajo la idea de que plataformas móviles constituyen la base racional de la diseminación de MβLs prevalentes (*e.g.* VIM-2) por THG, abordamos luego el análisis de la capacidad de movilización de la plataforma identificada en HB157 a patógenos oportunistas como *P. aeruginosa* y *E. coli*. Los ensayos de transferencia de ADN implicaron inicialmente la extracción de ADN plasmídico de cultivos de HB157 mediante sistemas comerciales seguido de transformación química, empleando *E. coli* DH5α como aceptora. Estos ensayos no permitieron obtener transformantes. Asimismo, experimentos de conjugación bipartita utilizando diferentes aceptoras (*E. coli* DH5α o *P. aeruginosa* PAO1) no permitieron obtener transconjugantes en las condiciones aquí planteadas (ítem II.4.1, Mats. y Méts.), aun cuando el control empleado, cepa LD209 portadora de pLD209 (Marchiaro et al., 2014), mostró transconjugantes (Tabla III.1.1). Así, los ensayos de transferencia de ADN empleados, efectuados por duplicado, no permitieron dilucidar la localización plasmídica de la plataforma portadora de *bla*_{VIM-2} lo que sugiere que se encuentra ubicado en el cromosoma (Tabla III.1.1). Alternativamente, el plásmido portador de *bla*_{VIM-2} podría no ser replicativo en *E. coli* o en *P. aeruginosa*, o ser un plásmido de gran tamaño que no sea transferible por las metodologías aquí empleadas.

Así, todos los resultados en conjunto revelaron que la cepa *P. monteilii* HB157 contiene un integrón (In528) asociado a un transposón tipo-Tn402 incompleto, inserto probablemente en cromosoma. El hallazgo de una plataforma nueva en la colección de cepas locales que incluye los genes *aacA4* así como *bla_{VIM-2}* muestra la profusa diseminación de estos dos genes de resistencia en distintas plataformas en *P. grupo putida*, y sugiere fuertemente la presión de selección a ambos antimicrobianos (Holbrook y Garneau-Tsodikova, 2018). La presencia de los genes *tniQ*, *tniB* y *tniA* así como la IRt del módulo *tni* de HB157 homólogos a los observados en pHN39-SIM sugiere que podrían contener los genes vinculados a la resistencia a mercurio contiguo al módulo, y por tanto proveer ventajas selectivas a esta cepa. Por último, el hallazgo de la estructura IRi-*intI1*-*dhfrB*-*aacA4*-*bla_{VIM-2}*-*tniC*-IS6100 presente en cromosoma tanto en HB157 como en la cepa *P. putida* PP112420 indica la formación de nuevas estructuras derivadas de sucesivos rearrreglos genéticos, fijadas en este caso en cromosoma, agregando evidencias de que *P. grupo putida* constituiría un reservorio ambiental de genes de resistencia. En este contexto, es de utilidad destacar que este grupo bacteriano (Meireles et al., 2013; Almuzara et al, 2007; Juan et al., 2010; Marchiaro et al., 2014), conforma un reservorio ambiental, dado que presentan capacidad de adaptarse y sobrevivir a diferentes ambientes, y para ello estas especies (sugeridas como “fábricas ambientales”; Meireles et al., 2013) ensamblan diversidad de plataformas genéticas móviles y/o novedosas, con mecanismos de resistencia, que derivan de una multiplicidad de rearrreglos genéticos.

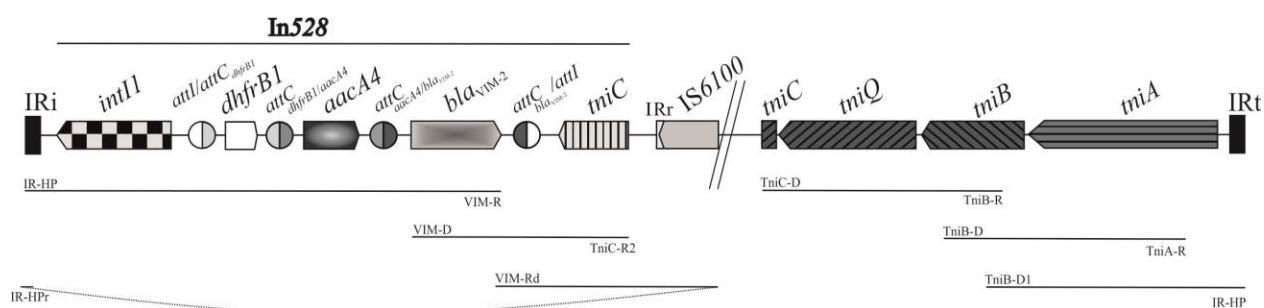


Figura III.1.5. Plataforma portadora de *bla_{VIM-2}* en *P. monteilii* HB157. La región correspondiente al integrón In528 está indicada en la parte superior de la estructura. Gen de la dihidrofolato reductasa *dhfrB1* (rectángulo con punta de flecha, blanco); IS6100 (rectángulo con punta de flecha, gris); IRr, IR “right” de IS6100 (repetición invertida derecha, gris claro). Los amplicones obtenidos por PCR (líneas sólidas, ítem II.3.4.1, Mats. y Méts.) empleando diferentes combinaciones de cebadores (Tabla II.1, Mats. y Méts.) son indicadas en la parte inferior de la figura. Amplicón obtenido de los cebadores IR-HP/VIM-Rd del ensayo de PCR inversa, en línea punteada. Doble línea transversal indica discontinuidad de la secuenciación de la plataforma. Para detalles de sitios de recombinación y genes codificantes de integrones clase 1, ver Fig. III.1.4.

III.1.2.2.3 Transposones tipo-Tn402 en *Pseudomonas* spp.

Los genes codificantes de MβLs transferibles han sido recuperados casi exclusivamente de BGN recuperados de muestras hospitalarias (Lister et al., 2009). Aun así, se desconocen los orígenes de dichos genes (Bush y Jacoby, 2010). Se ha postulado que las fuentes más probables incluyen a bacterias del medio ambiente (Lee et al., 2001; Bush y Jacoby, 2010). Estas bacterias pueden luego transferir estos determinantes de resistencia a BGN considerados consolidados (*i.e.* enterobacterias, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*) al compartir algún nicho ambiental. Numerosos estudios demostraron que los genes codificantes de la mayoría de las MβLs adquiridas se hallan asociados mayoritariamente a integrones de clase 1 con extremo 3' clásicos (ítem I.4.1.2). Por su lado, los integrones con extremo 3' inusuales se caracterizan por poseer configuraciones genéticas variables en el extremo 3', y han sido menos reportados debido a que la mayoría de los estudios han estado dirigidos a la identificación de las secuencias de los extremos 3'CS de integrones clásicos, o alternativamente, integrones inusuales han sido secuenciados sólo hasta el gen *tniC* (Santos et al., 2010; Samuelsen et al., 2010; Faccone et al., 2014; Hong et al., 2016). Así, la detección de estructuras de integrones inusuales con módulo de transposición completo se encuentra al presente subestimada (Toleman et al., 2007). En este contexto, resultados previos mostraron el hallazgo de dos integrones/transposones con la maquinaria de transposición completa cepas locales de *P. grupo putida*, aquí denominados Tn6335 y Tn6336. El objetivo aquí planteado es analizar la documentación de transposones tipo-Tn402 con maquinaria de transposición completa en *Pseudomonas* spp, con propósitos comparativos, y bajo la idea final de evaluar la distribución de estos elementos genéticos en este género bacteriano. Para ello, se efectuaron análisis por BlastN de la secuencia completa del módulo *tni* (*i.e.* *tniC*, *tniQ*, *tniB* y *tniA*) e IRt del extremo 3' inusual, como así también el extremo 5'CS (*i.e.* IRi, y el gen *intI*) de los transposones Tn6335 y Tn6336 contra base de datos específica de *Pseudomonas* spp. del NCBI (GenBank).

Los resultados de los análisis comparativos mostraron la presencia de transposones tipo-Tn402 con identidades nucleotídicas mayores al 90% y coberturas del 100% en 12 cepas de *P. aeruginosa* (Tabla III.1.3). En todos los casos, se detectaron los genes del módulo *tni*, el gen *intI* como así también ambas IR flanqueantes (IRi, IRt). Estos datos muestran que los transposones tipo-Tn402 completos se encuentran presentes en cepas de *P. aeruginosa*, no habiéndose reportado hasta el presente en otras especies del género, a excepción de *P. putida* (Juan et al, 2010; Marchiaro et al, 2014a). Las regiones variables de estos transposones presentan en su mayoría genes

codificantes de MβLs e incluye a *bla_{VIM-2}* en las cepas 802, DZ-B1, PA83, K34-7, AR444 y R22; *bla_{VIM-24}* en la cepa 1160; *bla_{IMP-1}* en la cepa 97; y *bla_{IMP-9}* en la cepa PA96 (Tabla III.1.3). Asimismo, SβLs sin actividad carbapenemasa han sido detectadas, entre ellas, *bla_{GES-1}* en la cepa AR_0353 y *bla_{OXA-2}* en la cepa AR_0353 (Tabla III.1.3). Por otro lado, ha sido identificado el gen *dhfrB* involucrado en la resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol en las cepas DZ-B1, PA83, K34-7 y AR444 (Tabla III.1.3). Por último, todas las cepas presentaron genes codificantes de proteínas modificadoras de aminoglucósidos (*aac(6')-II/aac3-Id/aacA4/aadB/aadA1b*) con excepción de AR_0353 y RW109; esta última sin genes en su región variable (Tabla III.1.3). Estos resultados muestran una esperable diversidad en las regiones variables de estos transposones. Es interesante destacar que solo la cepa 802 (derivada de una cepa clínica de un hospital de Argentina) presentó una plataforma idéntica al Tn6335, transposón prevalente en nuestra colección de cepas. Este resultado señala la importancia de conocer la epidemiología regional, dado que a excepción de clones epidémicos internacionales, la circulación de cepas así como de elementos genéticos suele tener connotaciones regionales. Por último, el Tn6336, el cual posee sólo *bla_{VIM-2}* en su región variable resultó ser único para *P. grupo putida*. La distribución de estos EGM completos en su maquinaria de transposición en otros grupos bacterianos, como enterobacterias, es aún materia de estudio; y proveerá mayor conocimiento de su distribución en la naturaleza.

La caracterización de los transposones Tn6335 y Tn6336 aporta conocimiento de la presencia de transposones completos con capacidad de movilizarse por transposición en cepas de especies diferentes de *P. grupo putida*. La búsqueda en bases de datos de los elementos genéticos correspondientes a la maquinaria de transposición en *Pseudomonas* spp. revela que hasta el momento han sido detectados sólo en *P. aeruginosa*. y en *P. grupo putida* (este trabajo; Juan et al, 2010; Marchiaro et al., 2014a). Estos resultados revelan la escasa información disponible sobre estos EGM, y sugieren que los mismos al presente se han subestimado. El estudio de plataformas móviles portadoras de genes de resistencia aporta mayor conocimiento del rol de bacterias ambientales en la diseminación de genes de relevancia clínica en ambientes asociados al cuidado de la salud. Este conocimiento es útil para comprender la importancia del control de infecciones asociado no sólo a la diseminación de BGN multirresistentes sino al control de la circulación de EGM; y de utilidad asimismo para que drogas, aún experimentales, puedan ser desarrolladas para el control de la promiscuidad, penetrabilidad, persistencia, y plasticidad de los elementos genéticos que codifican determinantes de resistencia (Baquero et al., 2011).

Tabla III.1.3. Cepas de *P. aeruginosa* portadoras de transposones tipo-Tn402 con maquinaria de transposición completa

Cepa	Genes en región variable ^a	Localización ^b	Número de acceso	Referencia
<i>P. aeruginosa</i> 802	<i>bla_{VIM-2}-aacA4</i>	pDCPR1	-	Vilacoba et al., 2014
<i>P. aeruginosa</i> DZ-B1	<i>bla_{VIM-2}-aacA4-dhfrB</i>	C	NBVZ01000065.1	Zhang et al., 2017
<i>P. aeruginosa</i> PA83	<i>aac(6')-II-bla_{VIM-2}-dhfrB-aac3-Id</i>	C	CP017293.1	Döbelmann et al., 2017
<i>P. aeruginosa</i> K34-7	<i>aac(6')-II-bla_{VIM-2}-dhfrB-aac3-Id</i>	C	CP029707.1	-
<i>P. aeruginosa</i> AR444	<i>aac(6')-II-bla_{VIM-2}-dhfrB</i>	C	CP029089.1	-
<i>P. aeruginosa</i> R22	<i>dhfrB-aacA4-bla_{VIM-2}</i>	-	AM993098.1	-
<i>P. aeruginosa</i> 1160	<i>aacA4-bla_{VIM-24}-aacA4</i>	p1160-VIM	MF144194.1	-
<i>P. aeruginosa</i> AR_0353	<i>aadB-aac(6')-II-bla_{OXA-2}-aadA1b-orf1-orf2-sul1</i>	C	CP027172	-
<i>P. aeruginosa</i> PA96	<i>aacA4-bla_{IMP-9}-aacA4</i>	pOZ176	KC543497.1	Xiong et al., 2013
<i>P. aeruginosa</i> 97	<i>bla_{OXA-10}-aacA4-bla_{IMP-1}</i>	C	CP031449.1	-
<i>P. aeruginosa</i> AR_0353	<i>bla_{GES-1}</i>	unnamed1	CP027173.1	-
<i>P. aeruginosa</i> HS87	<i>aacA4</i>	pHS87a	KR106190.1	Bi et al., 2016
<i>P. aeruginosa</i> RW109	-	plasmid 1	LT969519.1	-

^aLos genes de resistencia fueron identificados mediante ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>).

^bLa localización plasmídica de los transposones está indicada con el nombre del plásmido. C: localización cromosomal de los transposones. -: sin especificar

III.1.2.3. Caracterización de los plásmidos portadores de *bla_{VIM-2}* en *P. grupo putida*

La THG mediada por plásmidos conjugativos es uno de los eventos de mayor importancia clínica en la diseminación de genes de R entre bacterias sometidas a presión de selección antimicrobiana (Norman et al., 2009). La caracterización de los plásmidos aporta información esencial para comprender los mecanismos moleculares responsables de la movilización de los genes de resistencia a los antimicrobianos empleados en la clínica. En este contexto, la localización del transposón Tn6335 en plásmidos conjugativos en las cepas *P. grupo putida*/IV LD209 (pLD209) y HB313 (pHB313); *P. grupo putida*/II HE1012 (pHE1012); *P. grupo putida*/V BA9605 (pBA9605); y *P. grupo putida*/VII LA111 (pLA111), como así también del Tn6336 en *P. grupo putida*/IV BA7816 (pBA7816) ha sido previamente determinada (Tabla III.1.1; Marchiaro et al., 2014a; María S. Díaz, Trabajo Final Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica). El análisis de la secuencia del plásmido pLD209, recientemente reportada, mostró una organización genética modular característica de plásmidos conjugativos, cuyo origen evolutivo se halla asociado a bacterias ambientales y clínicas (Marchiaro et al., 2014). Asimismo, el análisis de la secuencia obtenida por pirosecuenciación del plásmido pLA111 recuperado de la especie *P. grupo putida*/VII, exhibió 99% de identidad nucleotídica con el plásmido pLD209 (Trabajo María S. Díaz, Trabajo

Final Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica). Así, el objetivo planteado en este trabajo fue evaluar la movilidad de *bla*_{VIM-2} mediado por plásmidos entre los diferentes miembros *P. grupo putida*. Para ello, se caracterizaron los cuatro plásmidos restantes mediante ensayos de digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Asimismo, el plásmido pBA7816 fue enviado a secuenciar por pirosecuenciación (ítems II.3.3. y II.6.2, Mats. y Méts.) debido a que es el único que porta el transposón Tn6336, a diferencia de los restantes, portadores de Tn6335.

Los productos de la purificación plasmídica de las cepas *E. coli* DH5 α transformantes productoras de VIM-2 incluyendo TF1012 portadora de pHE1012 (pTF1012), TF313 portadora de pHB313 (pTF313), TF9605 portadora de pBA9605 (pTF9605), TF111 portadora de pLA111 (pTF111) y TF7816 portadora de pBA7816 (pTF7816), así como de la cepa TF209 portadora de pLD209 (pTF209) empleada como control (Marchiaro et al., 2014a) fueron digeridos empleando *HindIII* y *EcoRI* en reacciones independientes, y los digestos corridos en geles de agarosa para su análisis (ítems II.3.5 y II.3.6, Mats. y Méts.). Los resultados de las digestiones con *HindIII* mostraron que los perfiles de restricción correspondientes a las seis transformantes presentan numerosas bandas comunes incluyendo las de ~ 20 kpb, 4,6 kpb, 3,5 kpb, 2,4 kpb, 1,5 kpb, 700 pb, y 500 pb (puntas de flecha celeste, calles 2, 4, 6, 8, 10 y 12, Fig. III.1.6.A). Sin embargo, el perfil de restricción de pTF9605 mostró variabilidad, exhibiendo una banda extra de ~6 kpb (punta de flecha blanca, calle 6). Por su parte, las digestiones con *EcoRI* mostraron asimismo numerosos fragmentos comunes entre los perfiles de restricción correspondientes a todas las transformantes, e incluye bandas de ~11 kpb, 4,7 kpb, 3,8 kpb, 2 kpb y 1,3 kpb (puntas de flecha celeste, calles 2, 4, 6, 8, 10 y 12, Fig. III.1.6.B). Sin embargo, han podido detectarse diferencias en los perfiles de restricción de pTF7816, pTF313 y pTF111 respecto al correspondiente control pTF209. Así, el patrón de pTF7816 presenta como diferencia dos bandas extras de ~8,6 kpb y 5 kpb (puntas de flecha blanca, calle 4) y ausencia de fragmentos de ~7,5 kpb y 5,7 kpb presentes en pTF209 (puntas de flecha negra, calle 2). Por su lado, los plásmidos pTF313 y pTF111 presentan una banda extra de ~8,6 kpb (puntas de flecha negra, calles 6 y 8) y ausencia del fragmento de ~7,5 kpb presente en pTF209 (puntas de flecha negra, calle 2). Por último, los perfiles de restricción de pTF1012 y pTF9605 muestran dos bandas adicionales (puntas de flecha negra, calles 10 y 12, respectivamente), respecto a las 5 comunes a todos los patrones, e idénticas a las exhibidas por el control pLD209. Es interesante notar que el patrón de bandas obtenido en pTF1012 tanto con *HindIII* como con *EcoRI*, es el mismo respecto a pTF209, lo que indicaría idénticas arquitecturas plasmídicas. Los restantes plásmidos pTF313, pTF7816, pTF9605 y pTF111 muestran con una u

otra enzima una o dos bandas de diferencia respecto al control pTF209 (Fig. III.1.6). El conjunto de estos resultados sugiere que los plásmidos analizados pHB313, pHE1012, y pBA9605 portadores del Tn6335, así como pBA7816 portador de Tn6336, aún con ciertas diferencias en sus perfiles de restricción, muestran una elevada similitud en la arquitectura respecto a pLD209, constituyendo así plásmidos relacionados y con un probable origen común. Este resultado se ve confirmado por la similitud en la secuencia nucleotídica completa (99%) entre pLD209 y pLA111, los cuales exhiben una banda de diferencia en sus perfiles de restricción (punta de flecha blanca, calle 8, Fig. III.1.6.B).

La comparación de las secuencias completas de los plásmidos es sin dudas, el método confirmatorio de su identidad (Cornaglia et al., 2011; Partridge, 2018). Las secuencias completas de pTF209 y pLA111, portadores de la plataforma Tn6335, y recuperados de las especies *P. grupo putida*/IV y *P. grupo putida*/VII mostraron homología, según trabajos previos de nuestro laboratorio (María S. Díaz, Trabajo Final Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica). En este contexto, bajo propósitos comparativos, se envió a secuenciar el plásmido pTF7816 (ítem II.6.2, Mats. y Méts.) portador del Tn6336 y proveniente de otro clon de *P. g. putida*/IV (PpGIV_A, Tabla III.1.2). Asimismo, los ensayos de digestión de pTF7816 con *Eco*RI mostraron dos bandas de tamaños ~8,6 kpb y 5 kpb, los cuales son únicos respecto a los digestos del resto de los plásmidos (Fig. III.1.6.B). Por ello, se hipotetizó que el entorno del Tn6336 podría ser distinto al resto de los plásmidos. Asimismo, el hallazgo de un segundo clon en la colección de cepas de *P. grupo putida*/IV (PpGIV_A, Tabla III.1.2) motivó la evaluación de los eventos genéticos intra-específicos que permitan comprender la THG entre cepas relacionadas filogenéticamente. El análisis de la secuencia completa de pTF7816 mostró 99% de identidad con pTF209 y pTF111 (Fig. III.1.7). Los genes que conforman el esqueleto de pTF209 incluyendo *repA*, codificante de la replicasa RepA, correspondiente a la región de replicación; los genes *parA* y *parB*, cuyos productos proteicos están involucrados en la segregación plasmídica, en la región de estabilidad; y el SST4 de la región de transferencia exhibieron identidades nucleotídicas >99%, respecto a los homólogos presentes en pTF7816 (Fig. III.1.7). Estos resultados sumados a las evidencias de fragmentos comunes en las digestiones por enzimas de restricción (Fig. III.1.6.B.), permiten concluir que son plásmidos similares. La principal diferencia entre pTF7816, y pTF209 (así como con pTF111) según análisis comparativos de las secuencias nucleotídicas radica en la variabilidad presente derivada de los transposones Tn6336 y el Tn6335, respectivamente (ítem III.1.2.2.1). Por último, el análisis de la secuencia nucleotídica de pTF7816 permitió identificar una secuencia de inserción, *IS1A*, de 768

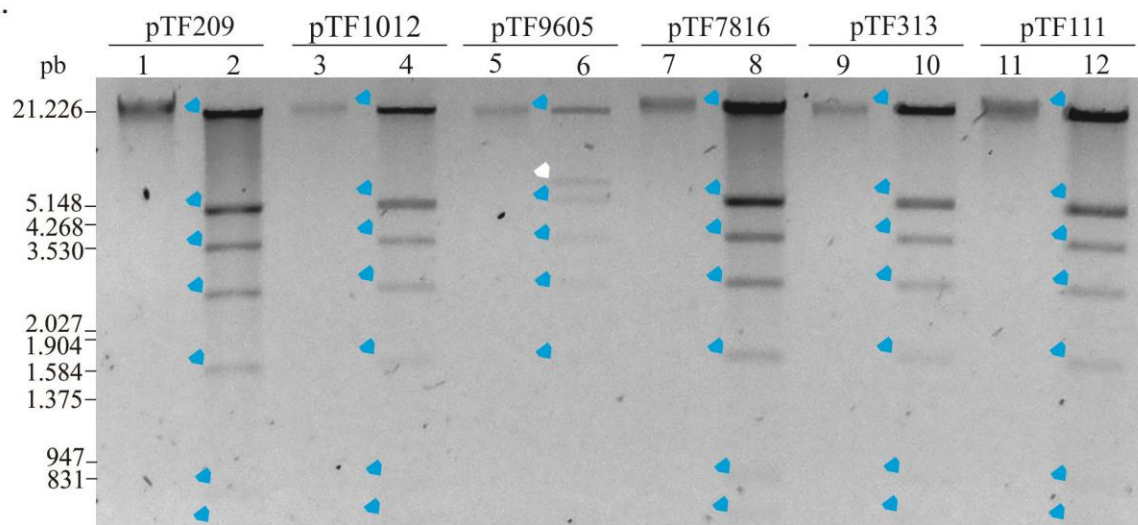
pb interrumpiendo el gen *virB10* (Fig. III.1.7). La misma está flanqueada por repeticiones directas de 9 pb idénticas (GCGTTGACG), y homólogas a las reportadas en base de datos para esta IS (www.isfinder.biotoul.fr), lo que evidencia un evento de transposición reciente. Llamativamente, el análisis de la secuenciación de pTF111 mostró la adquisición de la misma IS interrumpiendo el gen *virB8* (Fig. III.1.7). Bajo la hipótesis de que dicha inserción se debió a un evento de transposición *in vitro* en ensayos de transformación, se efectuó la búsqueda bioinformática de ISIA en el genoma de *E. coli* DH5 α . Se logró identificar que ISIA se encuentra presente en varias copias en el cromosoma de *E. coli* DH5 α . Así, se pudo concluir que al transformar *E. coli* DH5 α con plásmidos nativos de *P. grupo putida* las ISs estarían generando interrupciones en los módulos de transferencia de los plásmidos exógenos para evitar su movilización. De acuerdo a lo expuesto, las inserciones de ISAI en las secuencias de pTF7816 como en pTF111 han sido introducidas experimentalmente.

La evaluación de todos los resultados en conjunto permitió explicar las diferencias observadas en el perfil de restricción con *EcoRI* de pTF7816 (calle 4, Fig. III.1.6.B), respecto al perfil de pTF209 (calle 2). El fragmento de menor tamaño (~ 5 kpb) se debe a la ausencia de *aacA4* en Tn6336 respecto a la de 5,7 kpb de pTF209; y el de mayor tamaño (~ 8,6 kpb, calle 2) deriva de la adquisición de ISIA en reemplazo al de ~7,5 kpb del plásmido control. De manera similar, puede explicarse la variabilidad de fragmentos cuando se compara el perfil de pTF111 (calle 8, Fig. III.1.6.B) con el observado en pTF209. La banda detectada de ~8,6 kpb en la digestión con *EcoRI* de pTF111 (calle 8) es debida a la inserción de ISIA en reemplazo de la observada en el perfil del plásmido control, de ~7,5 kpb. Estas observaciones permiten asimismo hipotetizar respecto a las secuencias nucleotídicas de plásmidos no secuenciados al presente. En el plásmido pTF313, el fragmento correspondiente al tamaño de ~ 8,6 kpb (calle 6, Fig. III.1.6.B), en reemplazo al fragmento esperable de ~7,5 kpb de pTF209 (calle 2, Fig. III.1.6.B) podría asimismo deberse a la ganancia de una secuencia de inserción. Un evento similar pudo ocurrir en el plásmido pTF9605. El patrón de restricción del mismo al emplear *HindIII* mostró una banda extra de ~6 kpb (punta de flecha blanca, calle 6, Fig. III.1.6.A) respecto a pTF209 empleada como control (calle 2, Fig. III.1.6.A).

Así, los análisis comparativos de los tres plásmidos secuenciados mostraron que poseen los genes *repA*, *parA*, *parB*, y el SST4. Estos resultados muestran que el esqueleto de dichos plásmidos es el mismo. Por otra parte, los ensayos de digestión con enzimas de restricción de los seis plásmidos evaluados mostraron patrones de bandas similares, salvo excepciones que fueron

discutidas más arriba. El conjunto de estos resultados permiten denominar a los mismos como plásmidos tipo-pLD209, debido al reporte del primero de ellos, denominado LD209 (Marchiaro et al., 2014a). Por último, la presencia de plásmidos tipo-pLD209 se evidenció en los clones PpGIV_A (BA7816) y PpGIV_B (LD209, HB313, HP613) de la especie *P. grupo putida*/IV, así como en otras tres especies del grupo incluyendo *P. grupo putida*/II (HE1012), *P. grupo putida*/V (BA9605) y *P. grupo putida*/VII (LA111) (Tablas III.1.1 y III.1.2). Estos resultados en conjunto aportan evidencias de la movilización de *bla*_{VIM-2} por eventos de THG entre diferentes especies de *P. grupo putida* mediados por plásmidos tipo-pLD209, como así también del rol de *P. grupo putida* como reservorio de genes de resistencia.

A.



B.

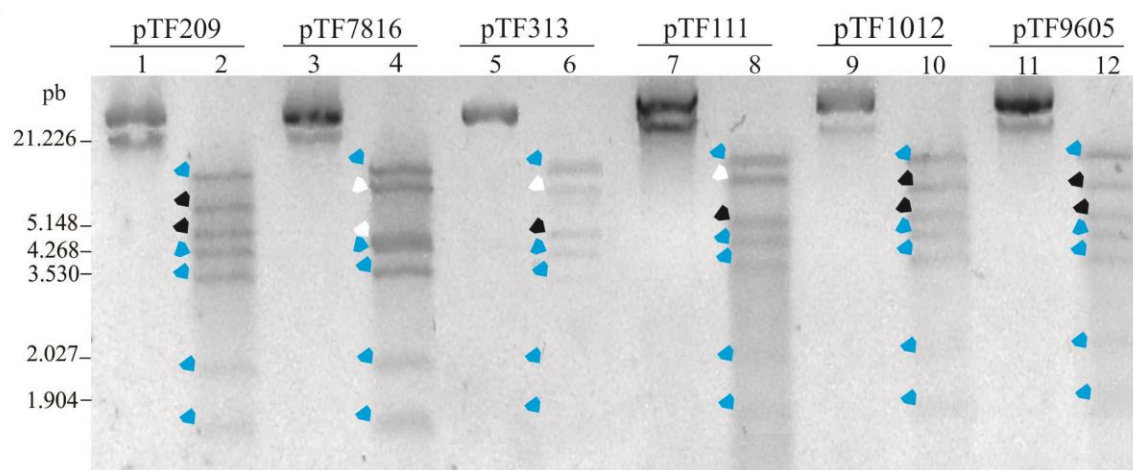


Figura III.1.6. Plásmidos de las transformantes *E. coli* DH5a conteniendo plásmidos portadores de *bla*_{VIM-2} de *P. grupo putida* (LD209, HE1012, BA9605, BA7816, HB313, LA111) digeridos con enzimas de restricción. A. Digestiones con *Hind*III. **B.** Digestiones con *Eco*RI. Calles impares: plásmidos sin digerir; calles pares: digestiones. Puntas de flecha celeste: bandas comunes; puntas de flecha blanca: bandas específicas de algunos plásmidos; puntas de flecha negra: bandas comunes con el control pTF209. Para detalles, ver texto. A la izquierda, marcador de tamaño molecular (pb), ADN λ digerido con *Eco*RI y *Hind*III.

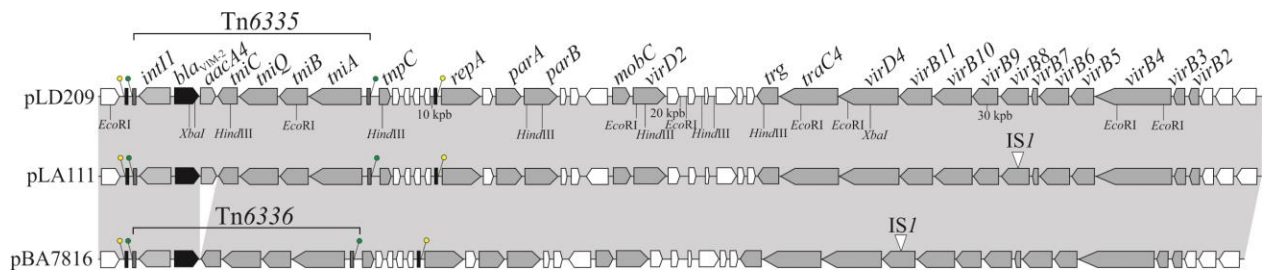


Figura III.1.7. Representación esquemática de los plásmidos pLD209, pLA111 y pBA7816. Los mapas genéticos lineales de pLD209 (KF840720.1), pLA111 y pBA7816 fueron comparados, indicando una identidad superior al 99,0% (regiones sombreadas en gris). Genes codificantes de proteínas descriptas: rectángulos con punta de flecha, grises. Genes codificantes de proteínas hipotéticas: rectángulos con punta de flecha, blancas. IS1: triángulo blanco, que indica el sitio de inserción en las transformantes TF111 y TF7816 (ver texto). Tn6335 y Tn6336 se indican arriba de los mapas lineales; las IR y las DR (GTTT) están indicadas con un rectángulo gris y una línea con círculo de color verde en el extremo, respectivamente; las IR y las DR (TATTC) del transposón deletado tipo-Tn3 está indicada con una línea con círculo de color verde en el extremo (Trabajo de Tesis Doctoral de Marchiaro P.). Sitios de digestión de *HindIII*, *EcoRI* y *XbaI*, y la escala (en kpb) se indican debajo del mapa lineal de pLD209. El sentido de la transcripción de los genes se indica según la dirección de las flechas.

III.1.2.4. Plataforma portadora de *bla*_{VIM-2} en una cepa local MR de *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos oportunistas humanos más importantes y uno de los principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales (Nicolau y Oliver; 2011). Una de las características más preocupantes de *P. aeruginosa* es su capacidad por adquirir múltiples determinantes de resistencia. Genes codificantes de MβLs son ampliamente detectados en cepas MR de *P. aeruginosa*, incluyendo los correspondientes a MβLs tipo-IMP, -VIM, -NDM, AIM-1, FIM-1, GIM-1, SPM-1, DIM-1 y SIM-2 (Nicolau y Oliver; 2011; Yong et al., 2012; Hong et al., 2015; Sun et al., 2016; Manohar et al., 2018). Estos genes se encuentran asociados frecuentemente a integrones y transposones, los cuales a su vez están asociados a plásmidos (Patridge et al., 2018). En este contexto, uno de los objetivos planteados fue dilucidar probables mecanismos de transferencia de marcadores de resistencia entre bacterias co-residentes epidemiológicamente que constituyen un reservorio de genes de resistencia (*i.e.* *P.* grupo *putida*) y patógenos nosocomiales (*i.e.* *P. aeruginosa*), mediante la caracterización de las plataformas genéticas portadoras de dichos genes. En este contexto, se caracterizó la plataforma portadora de MβL de una cepa clínica de *P. aeruginosa*, HV868, recuperada de un hospital de Rosario (HV) durante 2014. Este aislamiento resultó ser el primero de esta especie con MβL en dicho hospital, y su recuperación coincidió temporalmente con la de la cepa *P. monteilii* HB157 de otro nosocomio de Rosario, caracterizada en este trabajo como portadora del gen *bla*_{VIM-2} inserto en un transposón tipo-Tn402 incompleto (ítem III.1.2.2.2). Es interesante destacar que en el hospital del cual se aisló HV868 se habían recuperado previamente (año 2010) dos aislamientos clínicos de *P.* grupo *putida*

productores de VIM-2 (HV110, y HV310). La caracterización de estas 2 cepas mostraron que en ambas el gen *bla*_{VIM-2} se encuentra asociado a integrones clase 1 clásicos con diversidad de genes de resistencia en la región variable, y los mismos se localizan en cromosoma, según resultados de ensayos de transferencia de ADN (María S. Díaz, Trabajo Final Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica). El integrón clase 1 identificado en HV110 mostró los genes de R *bla*_{VIM-2}, *aadA1* y *aacA4* en la región variable del integrón, dispuestos en este orden; mientras que la región variable del integrón correspondiente a HV310, los genes de resistencia presentes son *bla*_{VIM-2}, *orfD*, *aacA4* y *bla*_{OXA-2}. Se aborda en este trabajo la caracterización de *P. aeruginosa* HV868, con énfasis en la determinación de la MβL, el estudio de su entorno genético, y localización genómica. Estos estudios permitirán determinar si existe similitud entre la plataforma de disseminación de *bla*_{VIM-2} de HV868 con aquellas identificadas prevalentemente en *P. grupo putida*, o alternativamente, con las plataformas de HV110 y HV310 recuperadas en el mismo hospital de origen. Asimismo, estos resultados aportarán evidencias sobre la capacidad de *P. grupo putida* de actuar como reservorios de genes de resistencia y de generar plataformas genéticas móviles capaces de transferirse a patógenos nosocomiales como *P. aeruginosa*. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana mediante VITEK-2 mostraron valores de CIMs correspondientes a la categoría de resistente para imipenem (≥ 16 µg/ml), meropenem (≥ 16 µg/ml), ceftazidima (64 µg/ml), cefepime (64 µg/ml), piperacilina/tazobactama (≥ 128 µg/ml) y ampicacina (≥ 64 µg/ml); y valores de categoría sensible para y gentamicina (8 µg/ml) y ciprofloxacina (1 µg/ml) según CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2018) (Tabla III.1.1). La confirmación bacteriana de *P. aeruginosa*, identificada por VITEK-2, se realizó mediante MALDI-TOF (ítem II.5.1) y análisis de la secuencia parcial del 16S ARNr. La caracterización de la plataforma portadora de MβL se efectuó de manera similar a lo expuesto para *P. monteilii* HB157 e incluyó, la determinación de la MβL, el estudio de su entorno genético, y su localización genómica mediante ensayos de PCR, cartografía por PCRs y transferencia de ADN, respectivamente (ver ítem III.1.2.2.2).

El valor hallado de “score” (2,43) del MALDI-TOF para la clasificación a nivel de especie del aislamiento HV868 confirmó la especie *P. aeruginosa*. Por su parte, el análisis de la secuencia parcial del ARNr 16S mostró un valor elevado de identidad (98%) con el ortólogo de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1. Así, ambas metodologías permitieron confirmar la asignación de HV868 a dicha especie.

El gen responsable de la resistencia a carbapenemes en HV868 es *bla*_{VIM-2} según ensayos de PCR/seguidos de secuenciación. El análisis del entorno genético mostró que la plataforma

portadora de *bla_{VIM-2}* exhibió 99% de identidad nucleotídica con el transposón tipo-Tn402 Tn6335, prevalente en la colección de cepas de *P. g putida* (Tabla III.1.1). Ensayos de transferencia de ADN, incluyendo transformación y conjugación utilizando HV868 como dadora y *E. coli* DH5 α como aceptora no permitieron obtener transformantes ni transconjugantes. Sin embargo, ensayos de conjugación empleando *P. aeruginosa* PAO1 resistente a rifampicina como aceptora permitieron recuperar transconjugantes resistentes a ceftazidima y productores de M β LS por ensayos fenotípicos (*e.g.* ensayos de sinergia con EDTA, ítem II.2.2, Mats. y Méts.). La portación del Tn6335 en las transconjugantes *P. aeruginosa* PAO1 (TCPAO868) fue confirmada mediante ensayos de PCRs con los pares de cebadores IR-HP/VIM-R; VIM-D/TniC-R; TniC-D/TniB-R; y TniB-D1/IR-HP (Tablas II.1 y II.2, Mats. y Méts.). Estos resultados muestran que *bla_{VIM-2}* (asociado al Tn6335) se localiza en un plásmido conjugativo con capacidad de replicar en *P. aeruginosa* y no en *E. coli* en las condiciones experimentales aquí planteadas, y sugieren así que es un plásmido de bajo rango de hospedador. Teniendo en cuenta que la cepa aceptora es de la misma especie que la dadora, se realizaron antibiogramas con múltiples antibióticos de las 3 bacterias para corroborar que TCPAO868 sea el resultado de la adquisición del plásmido portador de *bla_{VIM-2}*. Los resultados mostraron que el antibiograma de la transconjugante fue igual al de la cepa aceptora excepto por la resistencia a los β -lactámicos (datos no mostrados).

Para evaluar la hipótesis de que *P. grupo putida* transferiría plásmidos tipo-pLD209, prevalentes en cepas de nuestra colección, mediante conjugación a cepas filogenéticamente no relacionadas, como *P. aeruginosa*, se analizó la identidad entre extractos plasmídicos provenientes de ambas cepas. Para ello, se realizaron purificaciones plasmídicas por métodos comerciales y por extracción casera de la transconjugante TCPAO868 (ítem II.3.1, Mats. y Méts.) como así también de TF209, la cual contiene pLD209 (ítem III.1.2.3), usada como control. Luego, los extractos fueron digeridos con *EcoRI* y sometidos a electroforesis bajo la finalidad de comparar el patrón de bandas obtenidas (ítem III.1.2.3). Los resultados, efectuados por triplicado, mostraron en el caso del extracto conteniendo pLD209 las 7 bandas visualizadas anteriormente (calle 2, Fig. III.1.6) mientras que no pudo visualizarse un patrón de bandas discretas en el caso de los extractos de la transconjugante obtenidos por ambas metodologías (datos no mostrados). Esto sugiere que *bla_{VIM-2}* estaría codificada en plásmidos de mayor tamaño y/o corresponder a plásmidos de bajo número de copias. Este resultado sumado a la falla de recuperación de *E. coli* DH5 α transconjugantes empleando como dadora *P. aeruginosa* HV868, a diferencia de lo observado en el caso de las conjugaciones efectuadas con 5 cepas portadoras de plásmidos tipo-pLD209 (como dadoras) y *E.*

coli DH5a como aceptora (Tabla III.1.1), sugieren que *bla*_{VIM-2} no estaría incluida en un plásmido tipo-pLD209. Así, para visualizar el plásmido de *P. aeruginosa* HV868 se deben aplicar otras metodologías como la digestión con endonucleasa S1 seguido de electroforesis en campo pulsado.

La creciente diseminación de carbapenemasas transferibles, tanto en BNF, incluyendo a *Pseudomonas* y *Acinetobacter* como en enterobacterias constituye una problemática emergente y de crecimiento exponencial (Nicolau y Oliver; 2011, <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>). En los últimos años, el número de reportes de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes en Argentina creció considerablemente (Pasteran et al., 2005; Pagniez G et al., 2006; Cejas et al., 2008; Santella et al., 2010; Vilacoba et al., 2014; Labarca et al., 2016) aunque son escasos aquellos que describen la plataforma involucrada en la diseminación de los genes codificantes de las carbapenemasas. En este sentido, el reporte del plásmido pDCPR1 en las cepas clínicas extensamente resistentes a drogas, *P. aeruginosa* 802 y *S. marcescens* 68313 (Vilacoba et al., 2014) reveló la existencia de EGM portadores de *bla*_{VIM-2} en esta especie. La comparación de dicho plásmido con pLD209 (Marchiaro et al., 2014a) mostró regiones homólogas que incluye las regiones de replicación, estabilidad y adaptabilidad (Vilacoba et al., 2014). Es de destacar que el Tn6335 en pDCPR1 se encuentra presente bordeado por las mismas DR que en pLD209 (GTTTT) agregando evidencia de que el elemento que se disemina es el plásmido. Sin embargo, la región de transferencia en pDCPR1 se encuentra truncada por lo cual no es conjugativo como pLD209 (Marchiaro et al., 2014a). Así, ambos plásmidos comparten las regiones de estabilidad y replicación, y parcialmente la región de transferencia, consideradas el “esqueleto” plasmídico, por lo que puede ser incluido en el grupo de los plásmidos tipo-pLD209. Este reporte así como los resultados derivados de este trabajo reafirman la diseminación y circulación de estos plásmidos en diferentes especies de *Pseudomonas* y en enterobacterias como *Serratia marcescens* (Marchiaro et al., 2014, Vilacoba et al., 2014).

Evidencias de un plásmido en *P. aeruginosa* HV868 portador de *bla*_{VIM-2} en el Tn6335 permite mostrar la diseminación de este gen de resistencia vehiculizada mediante eventos que incluyen transferencia de EGM (*i.e.* plásmidos tipo-pLD209 u otros) que circularían entre cepas de *Pseudomonas* y enterobacterias en nuestro país, así como eventos de transposición intragenómicos (*e.g.* Tn6335 desde *P. grupo putida* a *P. aeruginosa*). Otros reportes ya han sugerido la diseminación de integrones/transposones tipo-Tn402 de clones diferentes de *P. putida* a *P. aeruginosa*, según observaciones de detección del mismo EG en cepas de ambas especies

recuperadas de un mismo hospital en el transcurso de 4 años (Juan et al., 2010). Evidencias de que *P. putida* constituiría un reservorio de genes de resistencia ha sido sugerida por la proporción observada en el hospital de infecciones por cepas clínicas portadoras de MβLs, 47 veces más alta para cepas de los grupos *P. putida*/*P. fluorescens* (8/57, 14%), que para cepas de *P. aeruginosa* (11/3694, 0,3%) (Juan et al., 2010). Sin embargo, el rol de plásmidos transferibles no ha sido evaluado. Finalmente, nuestras observaciones vinculan epidemiológicamente la plataforma prevalente portadora de *blavIM-2* (Tn6335) a plásmidos conjugativos que se transfieren entre diferentes especies del *P. grupo putida* (*P. putida*, *P. monteilii*, *P. grupo putida*/I, *P. grupo putida*/II, *P. grupo putida*/IV, *P. grupo putida*/V, *P. grupo putida*/VII; Tablas III.1.1 y III.1.2) así como con *P. aeruginosa* HV868. Asimismo, para este caso estudiado, la alternativa de transferencia de integrones clásicos observados para cepas co-residentes en el mismo hospital (*i.e.* HV110 y HV310) a HV868 no parece constituir el evento genético de elección.

III.1.2.5. Determinación de la localización genómica de las plataformas portadoras de *blavIM-2*

Observaciones previas del laboratorio resultantes de ensayos de transferencia de ADN sugirieron la portación cromosomal de las plataformas portadoras de *blavIM-2* en ciertas cepas de la colección local (Tabla III.1.1.). El objetivo específico planteado en esta parte del trabajo es proveer evidencias de los eventos de transposición inter- e intra-específico de las plataformas portadoras de *blavIM-2*. En la colección de cepas se ha determinado la portación plasmídica de *blavIM-2* para 7 cepas (BA7816, LD209, HB313, BA9605, LA111 y HV868) mientras que se ha sugerido la portación cromosomal en el resto de las cepas (BA9115, BA7908, HB157, BA9713, HP813, LA1008, HP613) según ensayos de transferencia (Tabla III.1.1). La confirmación de la localización de *blavIM-2* aportará evidencias de los eventos de transposición que ocurren en la naturaleza bajo la hipótesis de que los transposones Tn6335 y Tn6336 son los responsables de la diseminación de dicho gen de resistencia en las cepas de la colección de este estudio.

Para ello, se realizaron digestiones enzimáticas de los genomas de cada una de las 14 cepas de este estudio incluyendo las cepas de *P. grupo putida* (Tabla III.1.1) y *P. aeruginosa* HV868 (ítem III.1.2.4) con la enzima *Xba*I, como así también con la endonucleasa S1 (ítem II.3.8.1, Mats. y Méts.). Se utilizó *Xba*I debido a que es una enzima de corte infrecuente en *Pseudomonas* spp. (Hu y Manos, 2015) y por lo tanto es esperable un patrón de digestión conformado por bandas discretas de entre 20 y 30 en la corrida electroforética. Aun cuando la secuencia nucleotídica de *blavIM-2* contiene 2 sitios de corte posibles, la enzima seleccionada era adecuada para obtener un patrón de bandas que permita la separación adecuada de los fragmentos. Por otro lado, la

endonucleasa S1 es una enzima ampliamente utilizada para linealizar plásmidos, y permite así predecir el tamaño y cantidad de plásmidos presentes en una cepa (Barton et al., 1995; Santella et al., 2010).

Los productos de las purificaciones de ADN genómico y digestiones con *Xba*I y S1, en reacciones independientes fueron sometidos a electroforesis de campo pulsado o “pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)” (ítem I.3.8.1, Mats. y Méts.). Se empleó el contenido genómico de las 14 cepas de este estudio, incluyendo aquellas que se hipotetiza portan el gen *bla*_{VIM-2} en cromosoma (BA9115, BA7908, BA9713, HB157, HP813, LA1008, HP613), como así también aquellas que poseen plásmidos tipo-pLD209 portadores de *bla*_{VIM-2} (HE1012, BA7816, LD209, HB313, BA9605 y LA111) o plásmidos no tipo-pLD209 (HV868). El extracto genómico de la cepa LD209 ha sido empleado como control, dado que dicha cepa ha sido caracterizada profusamente, y secuenciada (dato no mostrado). A continuación del PFGE, los productos de las digestiones fueron transferidos a membranas de PVDF (ítem I.3.8.2, Mats. y Méts.). Por último, dichas membranas fueron utilizadas para ensayos de “Southern blot” usando como sonda *bla*_{VIM-2} marcada con biotina, y reveladas luego por método colorimétrico (ítem I.3.8.3, Mats. y Méts.). Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Servicio de Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS “Dr. Carlos G Malbrán”, Buenos Aires.

Las digestiones con S1 y posterior corrida electroforética (PFGE), efectuadas bajo el propósito de linealizar los plásmidos e identificarlos, se indican en las calles pares del gel (Fig. III.1.8). Los resultados de este experimento revelaron presencia de 1 plásmido de ~ 150 kpb en la cepa BA7908 (calle 4), 1 plásmido de ~35 kpb en HE1012 (calle 14), 2 plásmidos de ~100 y 40 kpb en BA7816 (calle 16), 1 plásmido de ~35 kpb en LD209 (calle 18), 2 plásmidos de ~80 y 35 kpb en BA9605 (calle 24), 2 plásmidos de ~75 y 40 kpb en LA111 (calle 26) y 1 plásmido de ~420 kpb en HV868 (calle 28) según se indica para cada banda observada (Fig. III.1.8). Los resultados observados están en concordancia con previas observaciones. Ha sido previamente estudiado (Marchiaro et al., 2014a; María S. Díaz, Trabajo Final Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica) que ensayos de transferencia de ADN permitieron obtener transconjugantes para las cepas HE1012, BA7816, LD209, HB313, BA9605 y LA111 (Tabla III.1.1). Posteriores análisis de digestión de los plásmidos obtenidos de las transconjugantes *E. coli* DH5α revelaron que son portadoras de plásmidos tipo-pLD209 de ~38 kpb (ítem III.1.2.3). Asimismo, la secuenciación de tres de los plásmidos de las transconjugantes, *i.e.* TF209, TF111 y TF7816 evidenció la homología (99% de identidad) entre los mismos (ítem III.1.2.3). En este contexto, los resultados de la corrida

electroforética de las digestiones de ADN genómico de las cepas bajo estudio confirman previas observaciones de presencia de plásmidos de tamaño esperado de ~ 35 kpb para las cepas HE1012 (calle 14, punta de flecha blanca, Fig. III.1.8), BA7816 (calle 16, punta de flecha blanca, Fig. III.1.8), BA9605 (calle 24, punta de flecha blanca, Fig. III.1.8), LA111 (calle 26, punta de flecha blanca, Fig. III.1.8) así como para la cepa control LD209 (calle 18, punta de flecha blanca, Fig. III.1.8). En el caso de la cepa HB313, para la cual era esperable un plásmido de tamaño similar, llamativamente no se observa dicha banda sugiriendo que ocurrió un evento de transposición del Tn6335 al cromosoma seguido de pérdida del plásmido, y será motivo de análisis. Es interesante notar que en los extractos de las cepas BA7816 (calle 16, punta de flecha celeste, Fig. III.1.8), BA9605 (calle 24, punta de flecha celeste, Fig. III.1.8) y LA111 (calle 26, punta de flecha celeste, Fig. III.1.8) se observa una banda adicional de tamaños de ~100 kpb, 80 kpb y 75 kpb, respectivamente. La posibilidad de que ambos plásmidos presenten el gen *bla_{VIM-2}* es motivo de estudio, y se dilucidará con el experimento de hibridización empleando como sonda dicho gen. En el caso de BA7908, los ensayos de transferencia de ADN no condujeron a la recuperación de transconjugantes resistentes a ceftazidima empleando comoceptoras *E. coli* DH5α o PAO1 (Tabla III.1.1). Sin embargo, se observa la presencia de un plásmido de ~150 kpb (calle 4, punta de flecha celeste, Fig. III.1.8) en la electroforesis de extractos genómicos digeridos con S1 mostrando así inicialmente la presencia de un plásmido distinto a los tipo-pLD209. Para el caso de la cepa HV868, se recuperaron transconjugantes portadoras de *bla_{VIM-2}* aunque los resultados de los ensayos de restricción no evidenciaron la presencia de plásmido (ver ítem III.1.2.4). Este resultado preliminar sugirió la presencia de un plásmido de alto tamaño molecular portador de dicho gen de resistencia, que no estaba contenido en los extractos plasmídicos obtenidos en las condiciones experimentales empleadas (ítem II.3.1, Mats. y Méts.). En el experimento de digestión con S1 y electroforesis, el extracto de HV868 digerido mostró un plásmido de ~420 kpb (calle 28, punta de flecha celeste, Fig. III.1.8), lo cual sugiere inicialmente que sería el portador de *bla_{VIM-2}*, en coincidencia con sugerencias expuestas anteriormente (ítem III.1.2.3). La ausencia de bandas compatibles con plásmidos tipo-pLD209 en digestos con S1 en las cepas BA9115 (calle 2, Fig. III.1.8), HB157 (calle 6), BA9713 (calle 8), HP813 (calle 10), LA1008 (calle 12), y HP613 (calle 20) coincide con los resultados previos que indicaban una probable portación cromosomal de *bla_{VIM-2}* para estas cepas (Tabla III.1.1). La visualización del gel no provee evidencias de otros plásmidos en las mismas. La electroforesis de los extractos genómicos empleando *Xba*I (calles impares, Fig. III.1.8) de todas las cepas incluidas en este análisis mostraron perfiles de bandas discretos, acorde con los

resultados esperables para la digestión con esta enzima en el género *Pseudomonas* (Gothues y Tunmmler, 1990; Hu y Manos, 2015).

Los ensayos de “Southern blot” subsiguientes empleando como sonda el gen *blav_{VIM-2}* se efectuaron bajo el objetivo de confirmar la portación plasmídica de este gen en plásmidos tipo-pLD209 (en cepas ya evaluadas por otros métodos); en plásmidos diferentes (*e.g.* en LA111, BA7908, BA7816, BA9605, y HV868) según evidencias obtenidas previamente en digestos con S1 (punta de flecha celeste, Fig. III.1.8); así como en cromosoma. En este último caso, sería esperable la portación cromosomal de *blav_{VIM-2}* en aquellas cepas portadoras del gen, en las cuales no fueron identificados plásmidos por ensayos previamente reportados (BA9115, BA7908, HB157, BA9713, HP813, LA1008, HP613, Tabla III.1.1). Asimismo, podría esperarse la portación cromosomal del gen en estudio en cepas que aun teniendo plásmidos, posean una segunda copia de *blav_{VIM-2}*. Los resultados obtenidos en las condiciones empleadas permitieron visualizar marcas para bandas de diferentes tamaños moleculares en las calles correspondientes a las digestiones con *XbaI* de las cepas que fueron reconocidas como portadoras de plásmidos con *blav_{VIM-2}* según ensayos de transferencia de ADN y/o secuenciación, *i.e.* HE1012, BA7816, LD209, HB313, BA9605, LA111, y HV868. Específicamente, se visualizó doble marca positiva tal lo esperable para las cepas portadoras de plásmidos tipo-pLD209 (LD209 empleada como control positivo, calle 19, puntas de flecha blanca, Fig. III.1.9), HE1012 (calle 15, puntas de flecha blanca), BA7816 (calle 17, puntas de flecha blanca), BA9605 (calle 25, puntas de flecha blanca), y LA111 (calle 27, puntas de flecha blanca). Estas últimas observaciones son esperables teniendo en cuenta que digestiones con *XbaI* en plásmidos tipo-pLD209 generan 3 fragmentos de 22 kpb, 15 kpb, y 300 pb (ítem III.1.2.3, Fig. III.1.7) los cuales contienen regiones parciales de *blav_{VIM-2}*. Así, las dos bandas que dan señal corresponden a los tamaños esperados de ~ 22 kpb y 15 kpb mientras que la banda de 300 pb probablemente se pierda en las condiciones ensayadas, debido a su bajo tamaño. En el caso del digesto de HB313 (calle 23, puntas de flecha con borde rojo, Fig. III.1.9), el tamaño molecular de la banda observada no resulta compatible con el tamaño esperado de plásmidos tipo-pLD209, lo cual sumado a evidencias previas del digesto con S1 que no revelaron presencia de plásmidos, sugiere que la marca inmunoreactiva correspondería a una banda cromosomal. En el caso del digesto con *XbaI* de extractos de HV868, se observó marca en una banda correspondiente a un tamaño de ~ 220 kpb (calle 29, punta de flecha amarilla, Fig. III.1.9). Aun cuando se evidenciaron señales positivas para los productos de las digestiones con *XbaI* de las cepas portadoras de los plásmidos tipo-pLD209 y del plásmido de HV868 (calles *XbaI*, flechas de punta blanca y amarilla,

respectivamente; Fig. III.1.9), los resultados del “Southern blot” obtenidos en las calles de las digestiones con S1 no permitieron obtener marca para las bandas de tamaños moleculares predichas. Esto podría deberse a la baja sensibilidad de la metodología de revelado utilizada (ítem II.3.8.3, Mats. y Méts). Los resultados generales muestran que la metodología empleada de digestión con *XbaI* y electroforesis seguida de “Southern blot” permitió reafirmar que *bla_{VIM-2}* en las cepas HE1012, BA7816, LD209, BA9605, LA111 y HV868 se localiza en plásmido tal como se evidenció inicialmente en los ensayos de transferencia de ADN y secuenciación en algunas de ellas (LD209, LA111 y BA7816) (Tabla III.1.1; ítem III.1.2.4.) y no en cromosoma. Asimismo, pudo revelarse que las cepas BA7816, BA9605, y LA111 no serían portadoras de *bla_{VIM-2}* en los plásmidos adicionales, según la ausencia de marca en el “Southern blot” en los tamaños indicados para plásmidos no tipo-pLD209 (flechas celestes, calles 16, 24, 26 respectivamente Fig. III.1.8), cuando se emplearon extractos digeridos con *XbaI*.

Los resultados de la digestión con S1 para las cepas con aparente portación cromosomal de *bla_{VIM-2}* (BA9115, BA7908, HB157, BA9713, HP813, LA1008, y HP613) y posterior “Southern blot” se observa señal en los casos de BA7908 (calle 4, punta de flecha roja, Fig. III.1.9), HB157 (calle 6, punta de flecha roja), BA9713 (calle 8, punta de flecha roja), LA1008 (calle 12, punta de flecha roja), y HP613 (calle 20, punta de flecha roja). Esta marca se observa en un tamaño molecular compatible con la banda de ADN cromosomal (no digerido por S1); resultados que confirmarían la localización cromosomal del gen de resistencia en estas cepas. En el caso de la cepa BA7908, tal como se expuso anteriormente, el plásmido visualizado en el digesto con S1 (calle 4, punta de flecha celeste, Fig. III.1.8), no resultó ser portador de *bla_{VIM-2}* según la ausencia de señal (calle 4, Fig. III.1.9). Si este resultado se debe a las debilidades en la detección del sistema empleado (ítem II.3.8.3, Mats. y Méts.) resta aún ser evaluado. Digestos con *XbaI* de las cepas expuestas arriba que mostraron señal positiva en las digestiones con S1, expusieron asimismo marcas luego de la inmunodetección (puntas de flecha con borde rojo, *i.e.* banda de ~300 kpb, cepa BA7908, calle 5; banda de ~60 kpb, HB157, calle 7; banda de ~80 kpb, BA9713, calle 9; banda de ~40 kpb, LA1008, calle 13; y banda de ~50 kpb, HP613, calle 21; Fig. III.1.9). Estos resultados combinados con la ausencia de banda en los digestos con S1 (en PFGE) confirmarían la localización cromosomal de *bla_{VIM-2}* para estas cepas. En el caso de las cepas BA9115 y HP813, la ausencia de bandas inmunorreactivas con digestos tanto con S1 como con *XbaI* no permiten confirmar fehacientemente la portación cromosomal y/o plasmídica. Sin embargo, los resultados de la carencia de transconjugantes resistentes, según experimentos de transferencia reiterados

(Tabla III.1.1) sumado a la no visualización de plásmidos en las digestiones con S1 (calles 2 y 4, Fig. III.1.8) conducen a hipotetizar que en dichas cepas la localización de *bla_{VIM-2}* es cromosomal. Restan aún repeticiones de los experimentos de detección de marca, empleando metodologías de mayor sensibilidad (Quinones-Falconi et al., 2010) así como ensayos que identifiquen el entorno genético de las plataformas portadoras de *bla_{VIM-2}* en dichas cepas.

Los resultados en conjunto aportan evidencia de localización cromosomal de *bla_{VIM-2}* en cepas de diferentes especies del grupo, incluyendo a *P. putida* (BA9115, BA7908), *P. monteilii* (HB157, BA9713), *P. grupo putida*/I (HP813) y *P. grupo putida*/II (LA1008). Además, se confirmó que las cepas de las especies *P. grupo putida*/II (HE1012), *P. grupo putida*/IV (BA7816, LD209, HB313), *P. grupo putida*/V (BA9605), *P. grupo putida*/VII (LA111) son portadoras de plásmidos tipo-pLD209, y que *P. aeruginosa* HV868 alberga un plásmido portador de *bla_{VIM-2}* de alto peso molecular que no es tipo-pLD209. Los resultados de los ensayos de hibridación permiten confirmar la presencia de una sola copia del gen, para todas las cepas en las cuales pudo observarse banda inmunorreactiva.

Finalmente, estas observaciones permiten concluir que el Tn6335 se encuentra activo en la naturaleza ya que se encontró tanto en los plásmidos tipo-pLD209 prevalentes entre las cepas incluidas en este trabajo de especies de *P. grupo putida* (e.g. *P. grupo putida*/II HE1012, *P. grupo putida*/IV LD209, *P. grupo putida*/IV HB313, *P. grupo putida*/V BA9605, *P. grupo putida*/VII LA111, Tabla III.1.1), como en un plásmido de mayor tamaño de *P. aeruginosa* (HV868), como así también en cromosoma de cepas caracterizadas como pertenecientes a especies diferentes de *P. grupo putida* (BA9115, BA9713, LA1008, HP813, HP613; Tabla III.1.1.). Por su parte, el Tn6336 también se encontraría activo ya que se detectó en plásmido de *P. grupo putida*/IV (BA7816) como en cromosoma de una cepa de *P. putida* (BA9115). El hallazgo de dichos transposones asimismo en diferentes especies del grupo (i.e. Tn6335 en *P. putida*, *P. monteilii*, *P. grupo putida*/I, *P. grupo putida*/II, *P. grupo putida*/IV, *P. grupo putida*/V, *P. grupo putida*/VII y Tn6336 en *P. putida*, *P. grupo putida*/IV) aporta evidencias indirectas de la movilización del gen de resistencia mediada por EGM (como plásmidos conjugativos) en eventos inter-específicos de transferencia de genes de resistencia, así como por transposones completos que podrían conducir su transposición (de plásmido a cromosoma, y viceversa).

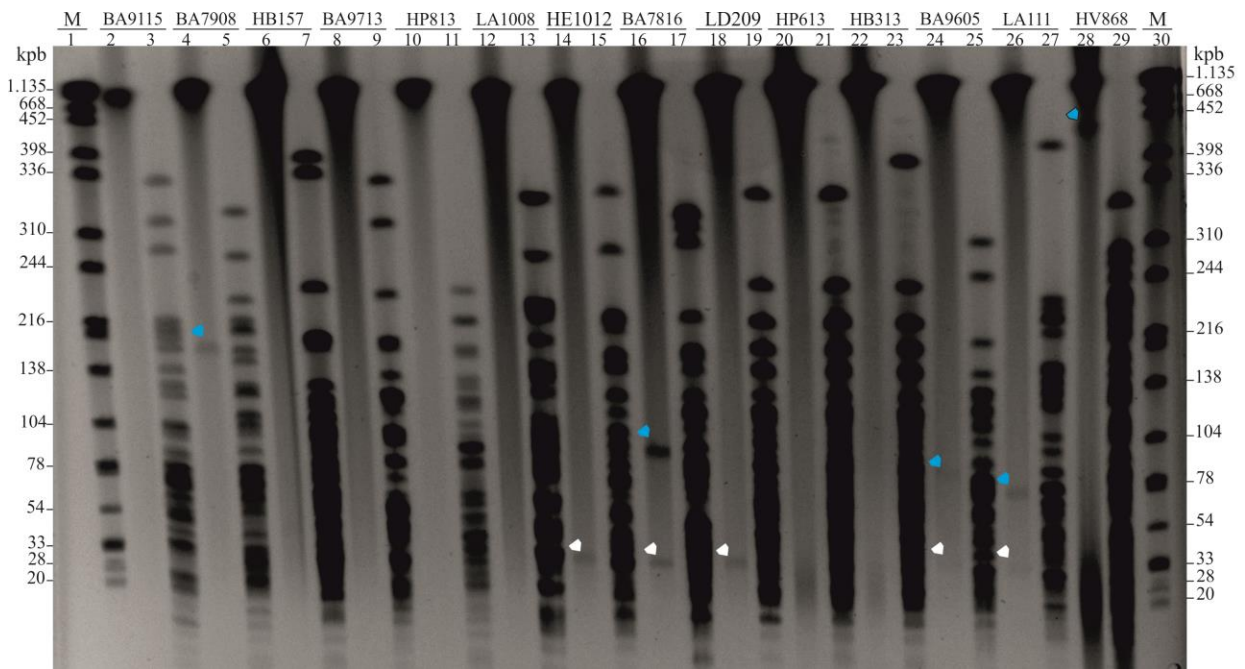


Figura III.1.8. PFGE de las digestiones con *Xba*I y S1 de los 14 genomas correspondientes a los aislamientos en estudio. Calles pares: genomas digeridos con *Xba*I; calles impares: genomas digeridos con S1; puntas de flecha blanca: plásmidos tipo-pLD209; puntas de flecha celeste: plásmidos no tipo-pLD209. Calles 1 y 30 (M): marcador de tamaño molecular (kpb), ADN de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup ATCC BAA664 digerido con *Xba*I.

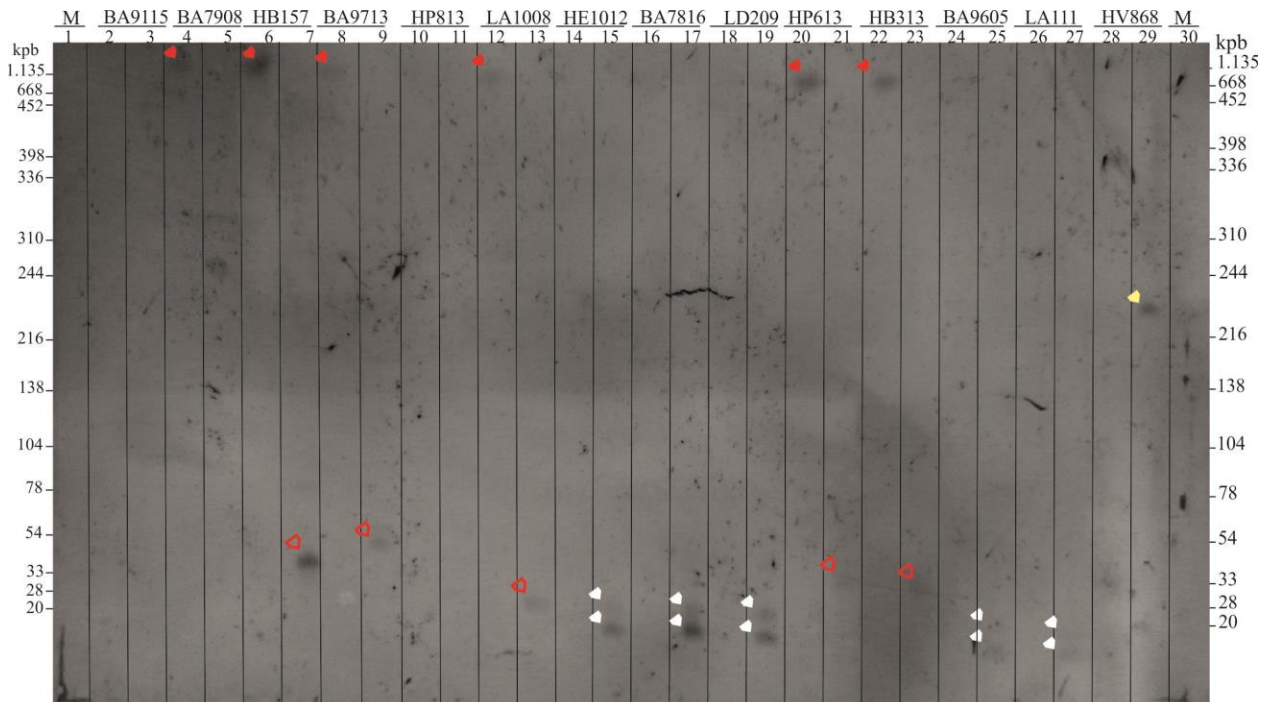


Figura III.1.9. Hibridación de los digestos obtenidos con *Xba*I y S1, empleando *bla*_{VM2} como sonda. Calles pares: genomas digeridos con *Xba*I; calles impares: genomas digeridos con S1; puntas de flecha blanca: señal positiva en plásmidos tipo-pLD209; punta de flecha amarilla: señal positiva en el plásmido de *P. aeruginosa* HV868; puntas de flecha con borde rojo: señal positiva en cromosomas. Calles 1 y 30 (izquierda y derecha): marcador de tamaño molecular (kpb), ADN de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup ATCC BAA664 digerido con *Xba*I.

III.1.2.6. Sitio de inserción del Tn6335 en cromosoma de cepas locales bajo estudio

Los transposones son EGM capaces de insertarse en diferentes sitios de los genomas bacterianos. En particular, los transposones tipo-Tn402 tienen como principales sitios de inserción a los sitios *res* (o sitios de resolución de multímeros) de la familia de transposones Tn3 por lo que han sido denominados como "cazadores de sitios *res*" (Minakhina et al., 1999). Otros sitios blanco descriptos son los sitios *res* del gen codificante de la resolvasa ParA (Tennstedt et al., 2005), o el gen *tet* del pBR322, así como sitios aleatorios del cromosoma de *P. aeruginosa* PAO1 o de *E. coli* K12 o de fago lambda (Petrovski et al., 2010). Recientemente, se reportó que el transposón tipo-Tn402 del plásmido pLD209 (ahora Tn6335) (Tabla III.1.1) se encuentra inserto en el gen codificante de transposasa (*tnpA*) del Tn3, evidenciando así un sitio blanco inusual (Marchiaro et al., 2014). Este evento de transposición generó una nueva plataforma, denominada arbitrariamente Tn9498 por su número de pares de bases, bordeadas por las IR flanqueantes correspondientes al Tn3 (Fig. III.1.10). Por lo tanto, *blav_{VIM-2}* podría diseminarse a través del plásmido, y/o por eventos de transposición que involucran al Tn6335 y/o a la nueva plataforma identificada (Tn9498). En este contexto, se evaluó el elemento genético involucrado en la movilización de *blav_{VIM-2}* en las cepas de nuestra colección. Seleccionamos como modelo de estudio cepas de clonales de *P. grupo putida*/IV (HP613 y LD209), portadoras ambas del Tn6335 (Tabla III.1.1). En estas cepas, la localización del transposón es plasmídica para LD209 (cepa control), y cromosomal en HP613 (Tabla III.1.1; ítem III.1.2.5). Un análisis semejante se efectuó empleando como modelo de estudio cepas no relacionadas clonalmente de la especie *P. grupo putida*/II, en las cuales el Tn6335 (y el Tn9498) se halla localizado en un plásmido tipo-pLD209 en la cepa HE1012, mientras que el Tn6335 se localiza en cromosoma en la cepa LA1008 (Tabla III.1.1; ítem III.1.2.5). La evaluación del contexto genético inmediato del Tn6335 en el cromosoma de HP613 y LA1008 aportaría evidencias de la capacidad de movilización del Tn6335, o del Tn9498. Para ello, se realizaron clonados de la región 5' del Tn6335 en ambas cepas, a partir de extracto de ADN genómico. La enzima de restricción empleada fue *EcoRI*, debido a que posee un sitio de corte en *tniB*, y otro en el *orfI*, localizado corriente arriba de la IRI, IR "left" del Tn9498, tomando como modelo pLD209 (Fig. III.1.10). Esto generaría un fragmento esperable de 5.065 pb (Fig. III.1.10) si el elemento se encuentra intacto en dichas cepas, los cuales además poseen *blav_{VIM-2}* entero que permite la selección con ceftazidima. La mezcla de ligación de los fragmentos digeridos y el vector de clonado (pSU18 *Cmp^R*) fueron utilizados para transformar *E. coli* DH5α (ítem II.3.7, Mats. y Méts.) con doble selección (cloranfenicol y ceftazidima). Posteriormente se seleccionaron clones para su estudio y

se secuenciaron los fragmentos clonados para analizarlos contra bases de datos del NCBI (GenBank).

En el primer caso, la secuencia nucleotídica del inserto clonado de HP613 (pSU18-HP613) mostró un tamaño de 9.032 pb. El análisis de dicha secuencia respecto a pLD209 reveló que la región que incluye desde el nt 3.725 al 9.032 es parte del Tn6335 abarcando desde IRi (rectángulo negro, Fig. III.1.11.A) hasta *tniB*, y que la región contigua corriente arriba de IRi (nt 1 al 3.724) no es parte del Tn9498 (Fig. III.1.11.A). Debido a la falta de homología de la región 5' del inserto (nt 1-3.724) respecto a pLD209 se analizó dicha región contra base de datos del NCBI (GenBank). El resultado de este análisis exhibió 98% de identidad nucleotídica con la región parcial del Tn501 (perteneciente al subgrupo del Tn21, ítem I.4.1.1) detectado en la cepa clínica *P. aeruginosa* Pavingil (KJ463833.1; Perez et al., 2014). Un análisis exhaustivo de esta región reveló la presencia de parte del Tn501 e incluye la región incompleta de IRr, IR "right" (nts 1-38); *tnpA* (nts 22-2.988), *tnpR* (nts 2.992 al 3.552) y, la región parcial del sitio *res* (nts 3.619-3.723) (Fig. III.1.11.A). Este resultado indica que el evento de transposición del Tn6335 interrumpió el sitio *res* del Tn501, siendo *resI* el sitio blanco específico (Fig. III.1.11.A.a). Ha sido reportado que el sitio *res* completo del Tn501 es de 119 pb (Fig. III.1.11.A.c; *P. aeruginosa* pVS1, Z00027.1, Stokes et al., 2007) siendo en el caso de HP613 truncado en el nt 105 mientras que en *P. aeruginosa* Pavingil en el nt 84 (Fig. III.1.11.A.a-b, respectivamente). En este último caso, el análisis de la secuencia nucleotídica de la región corriente abajo del Tn501 mostró que un transposón tipo-Tn402 se encuentra interrumpiendo el sitio *res* (Perez et al., 2014). Esta observación sumada a la presencia de las DR bordando el transposón tipo-Tn402 sugiere que la interrupción del Tn501 en *P. aeruginosa* Pavingil es un evento reciente. De esta manera, se comprobó que el Tn6335, y no el Tn9498, se encuentra presente en la cepa en estudio (HP613) sugiriendo que en la naturaleza es el Tn6335 el que se encuentra activo. Por último, teniendo en cuenta que las cepas LD209 y HP613 corresponden al mismo clon (PpGIV_B) aisladas en 2009 y 2013, es posible que eventos de transposición del Tn6335 (*e.g.* desde el plásmido pLD209 a cromosoma) hayan seleccionado una cepa (*e.g.* HP613) para evitar la pérdida de la resistencia por eventual curado del plásmido.

En el segundo caso, la secuencia nucleotídica del inserto clonado de LA1008 (pSU18-LA1008) mostró un fragmento de 9.749 pb. De manera similar al análisis efectuado para el fragmento clonado de HP613, la comparación pSU18-LA1008 respecto a pLD209 reveló que la región que incluye desde el nt 4.443 al 9.749 es parte del Tn6335 abarcando desde IRi hasta *tniB*, y que la región contigua corriente arriba de IRi (nt 1 al 4.442) no es parte del Tn9498 (Fig.

III.1.11.B). El análisis de la región desconocida (1-4.442) contra base de datos del NCBI (GenBank) mostró que el fragmento completo (4.442 nt) exhibió 99% de identidad nucleotídica con una región parcial del cromosoma de la cepa clínica de *P. putida* H8234 (CP005976.1; Molina et al., 2013). El análisis exhaustivo de esta región (desde 5' a 3') reveló la presencia parcial del gen *sucdh* (nt 1-142), codificante de una succinato dehidrogenasa; y una región parcial del transposón tipo-TnI403 que incluye la IRr completa (nts 711-748); *tnpA* (nts 744-3.716), *tnpR* (nts 3.719-4.282) y, parte del sitio *res* (nts 4.358-4.442) (Fig. III.1.11.B). Este resultado indica que el evento de transposición del Tn6335 interrumpió el sitio *res* del transposón tipo-TnI403, siendo la región intergénica entre *resI* y *resII* el sitio específico de transposición (Fig. III.1.11.B.a). El sitio *res* completo del TnI403 es de 119 pb en *P. aeruginosa* RPL11 (Fig. III.1.11.B.c; AF313472, Stokes et al., 2007) mientras que se observó que el sitio *res* en el fragmento clonado de *P. grupo putida/II* LA1008 es de 85 pb (Fig. III.1.11.B.a) y en el caso de *P. putida* H8234 es de 112 pb (Fig. III.1.11.B.b). De esta manera, se pudo comprobar que el Tn6335, y no el Tn9498, se encuentra presente en LA1008 tal como se evidenció en HP613. Es de destacar que en los dos aislamientos no clonales (LA1008 y HE1012) pertenecientes a la especie *P. grupo putida/II* (Fig. III.1.3. y Tabla III.1.2.) se halló el Tn6335 en dos entornos distintos mostrando la dinámica evolutiva de este grupo como reservorio de *blavim-2*.

Los principales sitios de inserción de los transposones tipo-Tn402 son los sitios *res* de los transposones Tn3 (Kholodii et al., 1995; Minakhina et al., 1999). En este estudio se halló que, en los dos modelos estudiados, el elemento genético que moviliza a *blavim-2* es el Tn6335 y que el lugar de inserción es el sitio *res* de los transposones de la familia Tn3, en concordancia a lo reportado (Minakhina et al., 1999). Sin embargo, vale la pena señalar que la inserción del transposón Tn6335 en diferentes regiones del sitio *res* en *P. grupo putida/IV* HP613 así como en *P. grupo putida/II* LA1008 muestra nuevos sitios blancos de inserción respecto a otros transposones tipo-Tn402 (Betteridge et al., 2011; Perez et al., 2014), lo cual confirma que diferentes regiones del sitio *res* podrían actuar como sitios específicos de transposición. Además, es de destacar que el Tn6335 en ambas cepas mencionadas se encuentra bordeado por otros elementos genéticos con potencialidad de movilización a través de la maquinaria de transposición de los Tn501 y TnI403, respectivamente, revelando la dinámica de este grupo de transposones para la formación de estructuras anidadas. En este sentido, es interesante observar numerosos reportes en *Pseudomonas* spp. de estructuras de esta naturaleza (e.g. Tn6006, Labbate et al., 2008, transposón tipo-Tn501, Perez et al., 2014; Tn6286, Sun et al., 2015). En este estudio se aportan evidencias de la plasticidad

de *P. grupo putida* al observar a *bla_{VIM-2}* en entornos diferentes, que incluyen diferentes elementos genéticos, en localizaciones genéticas variables, y en diferentes cepas y especies. Por último, la capacidad de almacenar los determinantes de resistencia en cromosoma sugiere que este grupo bacteriano constituye un reservorio estable de genes de resistencia.

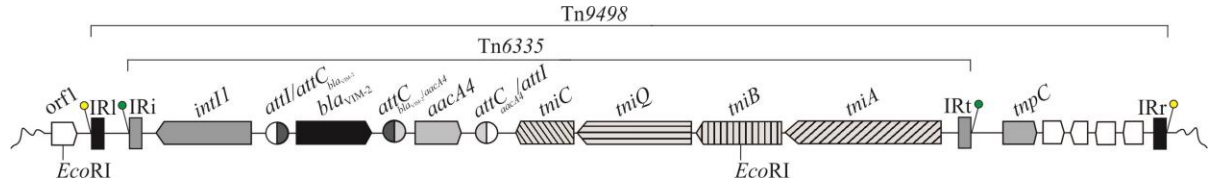


Figura III.1.10. Representación esquemática que muestra las regiones correspondientes a Tn6335 y Tn9498 en pLD209. Rectángulos grises: IRi e IRf, IR inicial y terminal, del Tn6335; y rectángulos negros: IRl e IRr (“left” y “right”) del Tn9498, respectivamente; *tnpC*: gen represor de la transposición; líneas con círculos verde y amarillo: DR del Tn6335 (GTTTT) y Tn9498 (TATTC), respectivamente. Los sitios *EcoRI* se indican con líneas verticales en la región inferior. Para más detalles ver también Fig. III.1.4.

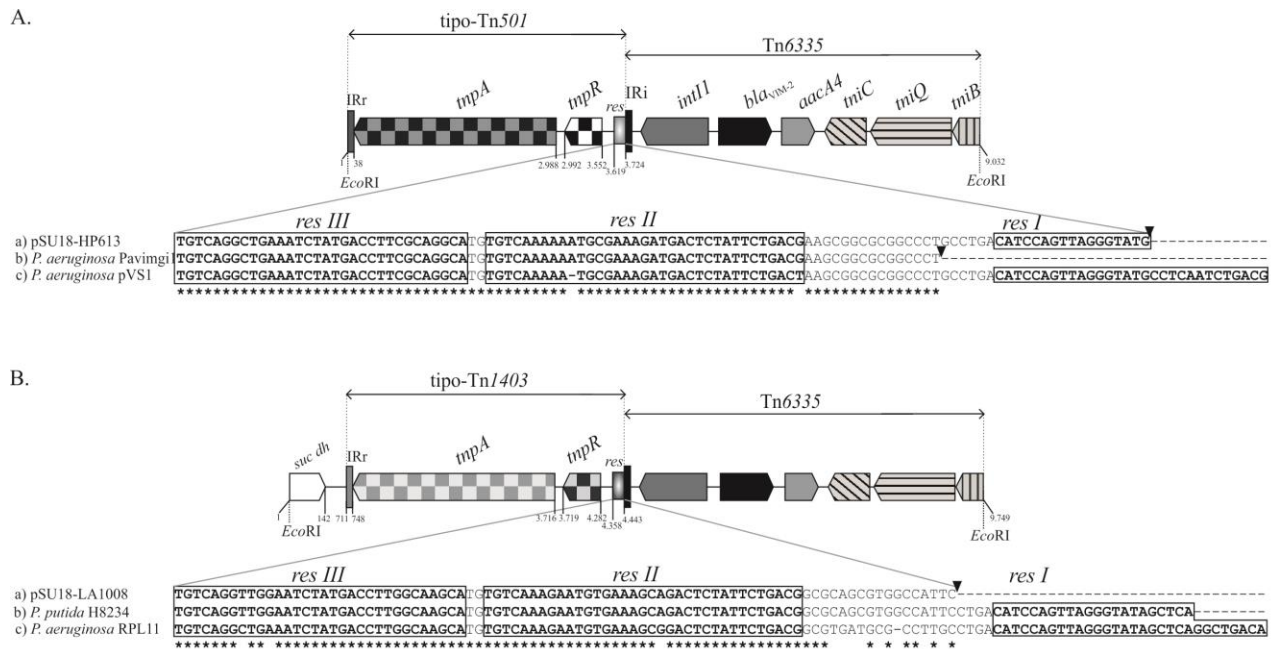


Figura III.1.11. Representación esquemática de los fragmentos clonados en pSU18 de extractos genómicos de *P. grupo putida*/IV HP613 y *P. grupo putida*/II LA1008. A. Se indica el sitio de inserción del Tn6335 en el sitio *res* del transposón tipo-Tn501 en *P. grupo putida*/IV HP613. Alineamiento de los sitios *res* de *P. grupo putida*/IV HP613, indicado como pSU18-HP613 (a), *P. aeruginosa* Pavimgil (b), y *P. aeruginosa* pVS1(c). B. Tn6335 inserto en el sitio *res* del transposón tipo-Tn1403 en *P. grupo putida*/II LA1008. Alineamiento de los sitios *res* de de *P. grupo putida*/II LA1008, indicado como pSU18-LA1008 (a), *P. putida* H8234 (b), y *P. aeruginosa* RPL11 (c). Sitio de recombinación *res*: *resI*, *resII*, *resIII*; *tnpA*: gen de transposasa; *tnpR*: gen de resolvasa; Δ *sucdh*: gen parcial de la succinato dehidrogenasa. Los asteriscos indican identidad de nucleótidos entre las 3 secuencias.

III.1.2.7. Modelo de diseminación del Tn6335 y Tn6336 en *Pseudomonas* spp.

Algunos autores han hipotetizado que microorganismos ambientales como *Pseudomonas* spp. (i.e. *P. monteilii*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens* y *P. pseudoalcaligenes*) constituirían un

reservorio de genes de MβLs, y de otros genes de resistencia, en diferentes nichos (e.g. aguas residuales nosocomiales, superficies de ámbitos nosocomiales, muestras clínicas Koh et al., 2004; Quinteira et al., 2005; Quinteira y Peixe; 2006; Scotta et al., 2011; Santos et al, 2010; Ocampo Sosa et al., 2015). En este contexto, la caracterización de pLD209 como un plásmido quimérico portador de *bla_{VIM-2}*, derivado de microorganismos ambientales así como clínicos llevaron a postular que *P. putida* actuaría como un nexo entre microorganismos ambientales y clínicos, ensamblando estructuras (i.e. pLD209) que facilitan su supervivencia en nichos diferentes (Marchiaro et al., 2014). La caracterización profusa en este Trabajo de Tesis de estructuras genéticas poseedoras de transposones con maquinaria de transposición completa, y en especies diferentes de *P. grupo putida* como en *P. aeruginosa* proponen un desafiante modelo de estudio para proveer evidencias de potenciales mecanismos de diseminación de genes de resistencia entre cepas de la misma especie, así como entre diferentes especies del género.

En síntesis, la caracterización de las plataformas portadoras de *bla_{VIM-2}* en la colección bajo estudio mostraron que el transposón tipo-Tn402 denominado Tn6335, portador de dicho gen de resistencia, es el elemento prevalente en la colección de cepas local incluida en este trabajo siendo detectado en 10 aislamientos clínicos de 7 diferentes especies de *P. grupo putida* incluyendo *P. putida*, *P. monteilii*, *P. grupo putida/I*, *P. grupo putida/II*, *P. grupo putida/IV*, *P. grupo putida/V* y *P. grupo putida/VII* (Tablas III.1.1. y III.1.2); así como en *P. aeruginosa* HV868 (ítem III.1.2.4.). Otro transposón tipo-Tn402 detectado, denominado Tn6336, se halló en dos cepas de las especies *P. putida* y *P. grupo putida/IV* (Tablas III.1.1. y III.1.2). Por último, en la cepa *P. monteilii* HB157 se detectó un transposón tipo-Tn402 incompleto (ítem III.1.2.2.). Por otra parte, se evaluó la presencia de dichos transposones en plásmidos tipo-pLD209, o en cromosoma (y su sitio blanco), dependiendo de la cepa bajo estudio según ensayos de transferencia, secuenciación, y localización genómica de los transposones. El conjunto de los resultados conducen a proponer eventos hipotéticos que explicarían la profusa diseminación de *bla_{VIM-2}*. Estos eventos incluyen la movilización de elementos que exhiben maquinaria de transposición completa como Tn6335 y Tn6336 (Fig. III.1.12) entre diferentes cepas y/o especies de *P. grupo putida* y *P. aeruginosa*; así como eventos de conjugación de plásmidos transferibles tipo-pLD209.

Los resultados de la caracterización taxonómica y molecular reveló la diversidad de especies (y de clones) de *P. grupo putida* involucradas en la diseminación de *bla_{VIM-2}* (Tabla III.1.2), lo cual señala inicialmente que la movilización de este gen no está ligada a un clon específico. Las cepas clonales *P. grupo putida/IV* LD209 y HB313 (aisladas en 2009 y 2013; Tabla

III.1.1) presentan el Tn6335 en plásmidos tipo-pLD209, mientras que la cepa restante del mismo clon, HP613 (Pgp4_B; Fig. III.1.3; Tabla III.1.2), presenta el mismo elemento inserto en el sitio *res* de un transposón tipo-Tn501 (Fig. III.1.11A.) localizado en cromosoma. Así, los eventos probablemente involucrados en este caso incluyen la ganancia del Tn501 por TH, y posterior transposición del Tn6335 al sitio *res* del mismo (Fig. III.1.12.A). Esta hipótesis se vería confirmada ya que la secuencia del genoma completo de LD209 (dato no mostrado) no presenta el Tn501, lo que sugiere un evento evolutivo que selecciona a HP613, e incluye la consiguiente pérdida del plásmido pLD209 (Fig. III.1.12.A), en coincidencia con ensayos de transferencia de ADN (Tabla III.1.1) y “Southern blot” (ítem III.1.4). Por otro lado, la cepa correspondiente a *P. grupo putida*/IV BA7816 (Tabla III.1.2; clon Pgp4_A, Fig. III.1.3) es también portadora de un plásmido tipo-pLD209 (Tabla III.1.1) lo que evidencia la conjugación intra-específica de pLD209 entre cepas o clones de la especie *P. grupo putida*/IV (e.g. desde LD209) (Fig. III.1.12.B). La subsiguiente pérdida del casete de resistencia de *aacA4* sería el evento involucrado para la selección del Tn6336, generándose así el plásmido pBA7816 en *P. grupo putida*/IV BA7816 (Fig. III.1.12.B). Este último evento es probable ya que los casetes más lejanos al promotor localizados corriente abajo del gen de la integrasa, son los que tienen menos posibilidades de ser transcritos y por lo tanto son más propensos a ser suprimidos (Darmon y Leach, 2014).

Eventos de conjugación inter-específica mediados por plásmidos tipo-pLD209 entre cepas de diversas especies del grupo constituyen eventos probables, y hay evidencia de esto dado que dichos EGM han sido detectados en *P. grupo putida*/II (HE1012, Fig. III.1.12.D), y *P. grupo putida*/VII (LA111, Fig. III.1.12.F). Es interesante notar los resultados obtenidos para las dos cepas de *P. grupo putida*/II de la colección local (HE1012 y LA1008; ítems III.1.2.3 y III.1.2.5). La adquisición de un plásmido tipo-pLD209 en cepas de esta especie (i.e. HE1012) podría desencadenar el posterior evento de diseminación intra-específica a otra cepa (i.e. LA1008). Al evidenciarse la localización del Tn6335 en cromosoma de LA1008 a partir de ensayos de transferencia de ADN (Tabla III.1.1) como así también de “Southern blot” (ítem III.1.2.5) se realizaron ensayos de clonado para detectar el sitio de inserción del EG en LA1008. Los resultados obtenidos sugieren la ocurrencia del evento de transposición del Tn6335 al sitio *res* de un transposón tipo-Tn1403 de la familia Tn3 en cromosoma (Figs III.1.11.B y III.1.12.D). Así, de manera similar a lo expuesto para LD209 y HP613, la consiguiente pérdida del plásmido tipo-pLD209 selecciona la cepa *P. grupo putida*/II LA1008 (Fig. III.1.12.D). Reportes nacionales documentan plásmidos tipo-pLD209 en cepas extensamente resistentes de *P. aeruginosa* y *S.*

marcescens, aportando así datos adicionales de la circulación de estos EGM portadores de *bla*_{VIM-2} en diferentes especies bacterianas así como en diferentes regiones del país (Marchiaro et al., 2014a; Vilacoba et al., 2014).

Evidencias de portación cromosomal del Tn6335 han sido observadas para las especies *P. monteilii* (BA9713), *P. grupo putida*/I (HP813) y *P. putida* (BA7908) según ensayos de transferencia de ADN (Tabla III.1.1) como de “Southern blot” (ítem III.1.2.5). En estos casos, el Tn6335 en las cepas correspondientes a *P. monteilii* BA9713 (Fig. III.1.12.C), *P. grupo putida*/I HP813 (Fig. III.1.12.E), y *P. putida* BA7908 (Fig. III.1.12.G) derivarían de eventos de conjugación inter-específica de plásmidos tipo-pLD209, seguido de transposición del EG a cromosoma. Eventos semejantes podrían deducirse de lo observado con el Tn6336 en *P. putida* BA9115 (Fig. III.1.12.H), donde es probable que medie un evento de conjugación del pBA7816 desde otra especie (*i.e.* *P. grupo putida*/IV) a *P. putida*, seguido de transposición del Tn6336. Rearreglos genéticos de la cepa BA7908 de la misma especie (*P. putida*), que incluyan la pérdida del casete de *aacA4* desde Tn6335 cromosomal no pueden ser descartados (no mostrado); seleccionándose así *P. putida* BA9115 (Fig. III.1.12.H). El In899 que forma parte de la estructura del Tn6336 (ítem III.1.2.2.1) ha sido hallado asimismo en un plásmido de 55 kb que deriva de un aislamiento clínico de *Pseudomonas chlororaphis* de un paciente de un hospital de Mendoza (Facone et al., 2014). Este resultado muestra la movilización de dicho integrón vehiculizado por diferentes plataformas, agregando evidencia de la circulación activa de EG que vehiculizan *bla*_{VIM-2} entre diferentes especies ambientales de *Pseudomonas*.

Por último, el Tn6335 puede transponer a otros EGM de especies patógenas oportunistas, tal como pudo ser evidenciado en *P. aeruginosa* HV868. En esta cepa, un plásmido distinto a los tipo-pLD209, de elevado tamaño molecular y bajo rango de hospedador sería portador del Tn6335, según resultados de ensayos de transferencia de ADN y “Southern blot” (ítem III.1.2.4). Estos resultados evidencian eventos de conjugación desde *P. grupo putida* (*i.e.* LD209) a *P. aeruginosa*, seguido de transposición del EG a un plásmido de esta última especie, con la subsiguiente pérdida del plásmido tipo-pLD209, finalmente seleccionando a *P. aeruginosa* HV868 (Fig III.1.11.J). Estos eventos son probables teniendo en cuenta el reporte de la cepa *P. aeruginosa* 802 portador del plásmido no conjugativo pDCPR1 (Vilacoba et al., 2014) homólogo a plásmidos tipo-pLD209 (ítem III.1.2.4). Así, este hallazgo revela que plásmidos tipo-pLD209 serían EGM asociados a la diseminación de *bla*_{VIM-2} entre *P. grupo putida* y *P. aeruginosa*. Este hallazgo evaluado mediante el análisis de la primer cepa multirresistente local de *P. aeruginosa* productora de VIM-2, es

ciertamente sorprendente, dado que otros reportes de vinculación epidemiológica de plataformas de movilización de *bla_{VIM-2}* empleando numerosas cepas de *P. grupo putida* y *P. aeruginosa* no hallaron EG comunes entre ambos grupos bacterianos (Peter et al., 2017). Por último, el hallazgo de una nueva plataforma en *P. monteilii* HB157 podría ser resultado de numerosos eventos genéticos que incluyen la transposición del Tn6336 a cromosoma; adquisición consecutiva de los genes *aacA4*, *dhfrB1*; inserción de IS6100 corriente arriba de *tniC*; y pérdida de los genes *tniQ*, *tniB* y *tniA* (no mostrado en Fig. III.1.12).

En síntesis, el modelo propuesto implica esencialmente eventos de transferencia por plásmidos tipo-pLD209 mediante conjugación intra- e interespecífica, así como eventos genéticos que incluyen transposición, rearrreglos genéticos (*e.g.* deleciones) y pérdida de plásmidos (Fig. III.1.12). Las bases moleculares de los eventos hipotéticos propuestos se basa en la caracterización taxonómica de las cepas en estudio (ítem III.1.2.1), la caracterización de las plataformas portadoras de *bla_{VIM-2}* (ítems III.1.2.2, III.1.2.3 y III.1.2.4), así como en la localización genómica y/o sitios de inserción de dichas estructuras (ítems III.1.2.5 y III.1.2.6). Los resultados tomados en conjunto permitieron evidenciar una asombrosa movilización de *bla_{VIM-2}* en *Pseudomonas* spp. mediada principalmente por plásmidos tipo-pLD209. Asimismo, numerosas evidencias indirectas indican que ocurrieron eventos de transposición de Tn6335 y Tn6336 a cromosoma, lo que sugeriría no solo que los transposones están activos sino también la fijación cromosomal de la resistencia en distintas especies. Es importante destacar que la diseminación de *bla_{VIM-2}* a *P. aeruginosa* muestra la relevancia del estudio de microorganismos que se constituyen en reservorios nosocomiales de genes de resistencia tal como ha sido descrito en este trabajo, incluyendo diferentes especies de *P. grupo putida*, y más aún, especies nuevas de este grupo no caracterizadas al presente. Por otra parte, ensayos de transferencia de ADN empleando cepas de *P. grupo putida* como dadoras y *E. coli* DH5α comoceptoras de plásmidos tipo-pLD209 (en este trabajo); así como reportes de estos replicones en *S. marcescens* (Vilacoba et al., 2014) documentan la diseminación de *bla_{VIM-2}* a enterobacterias. Así, el conjunto de estas observaciones aporta evidencia de la profusa diseminación de estos determinantes de resistencia a patógenos nosocomiales de mayor virulencia como *P. aeruginosa* y enterobacterias. En este contexto, las cepas de la colección local han constituido un apropiado modelo de bacterias ambientales, que facilitaron evidenciar mecanismos de ensamble, y de diseminación de estructuras portadoras de un gen de resistencia de alto impacto clínico, como *bla_{VIM-2}*.

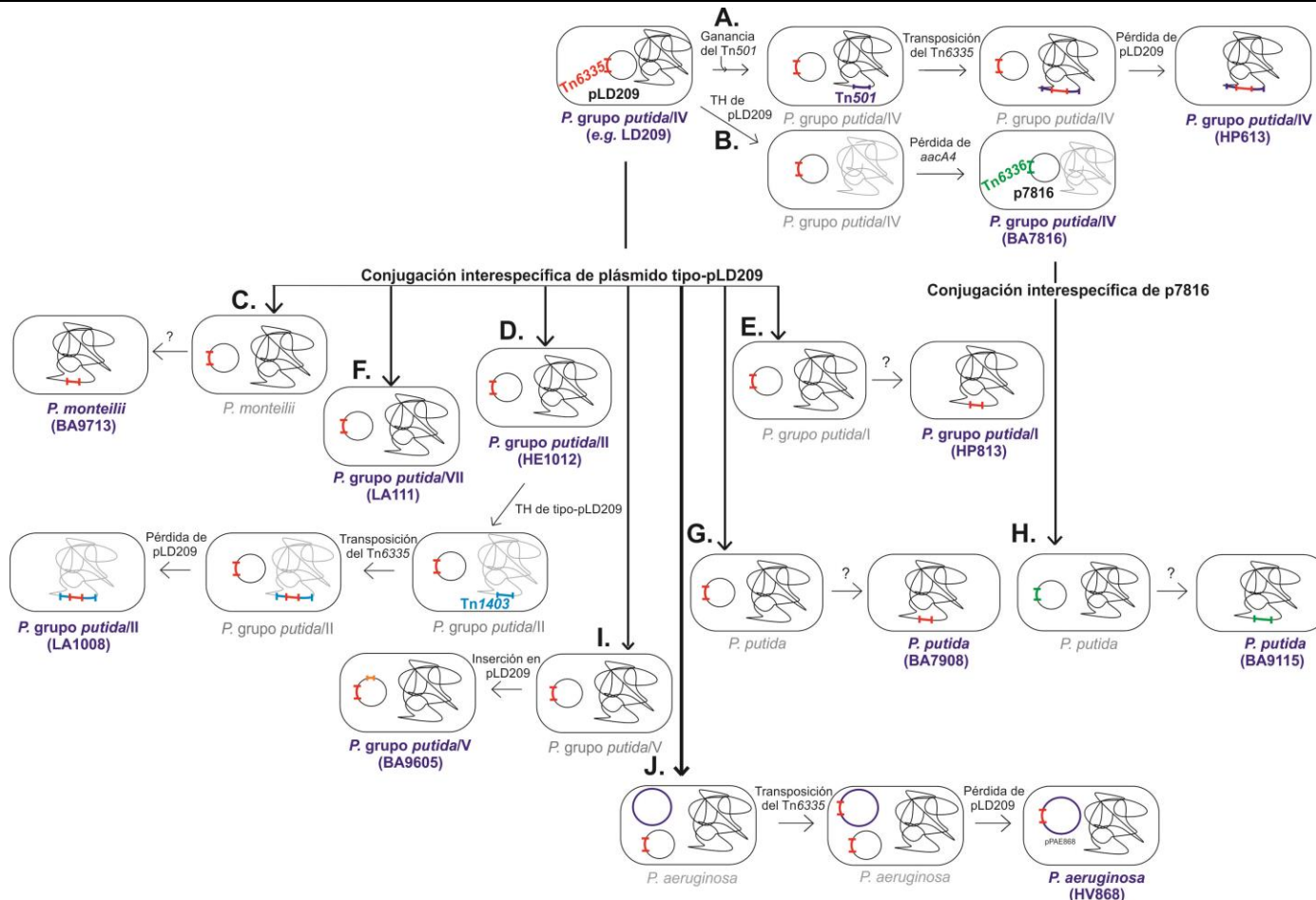
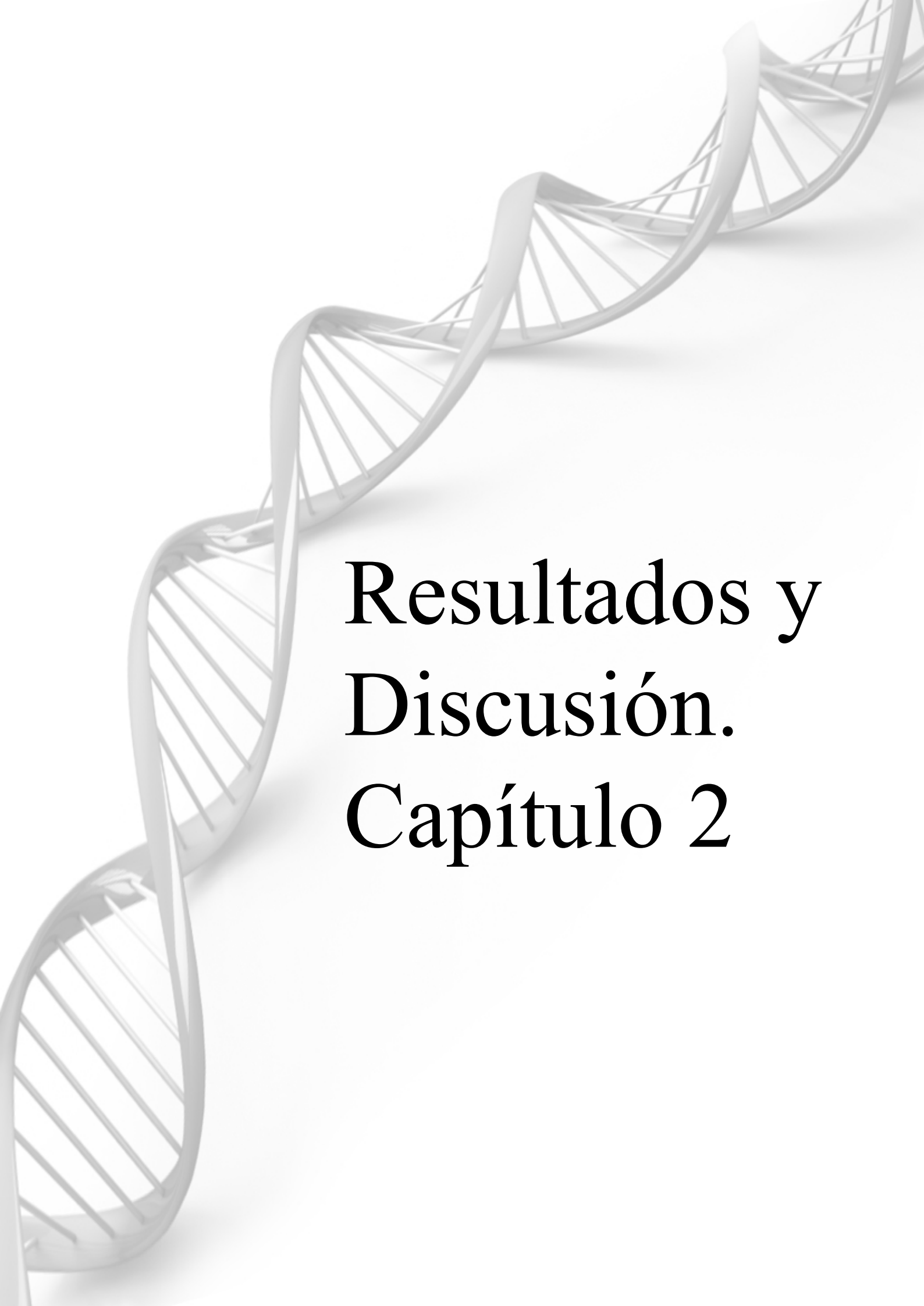


Figura III.12. Representación esquemática de eventos hipotéticos de diseminación de *bla*_{VIM-2} entre miembros de *Pseudomonas* spp. Especies y cepas de la colección, en azul; intermediarios hipotéticos, en gris (debajo de cada célula). Eventos probables, arriba de las flechas. Tn6335, en rojo; Tn6336, en verde. **A.** Movilización de plásmido tipo-pLD209 de *P. grupo putida/IV* (e.g. LD209), inserción del Tn6335 en el sitio *res* del Tn501 y pérdida del plásmido. Se selecciona HP613. **B.** Movilización de tipo-pLD209 a otra cepa de *P. grupo putida/IV* seguido de pérdida del casete de *aacA4*. Se selecciona BA7816 portadora de pBA7816. **C.** Movilización de tipo-pLD209 y transposición del Tn6335 a cromosoma de *P. monteilii*. Se selecciona BA9713. **D.** Movilización de plásmido tipo-pLD209 a *P. grupo putida/II*. Se selecciona HE1012. Transferencia intraespecífica a otra cepa de la misma especie, y transposición del Tn6335 al sitio *res* del Tn1403. Se selecciona LA1008. **E.** Movilización de tipo-pLD209 y transposición del Tn6335 a cromosoma de *P. grupo putida/I*. Se selecciona HP813. **F.** Movilización de plásmido tipo-pLD209 a *P. grupo putida/VII*. Se selecciona LA111. **G.** Movilización de tipo-pLD209 a *P. putida*, transposición del Tn6335 y pérdida del plásmido. Se selecciona BA7908. **H.** Movilización de pBA7816 a *P. putida*. Se selecciona BA9115. **I.** Movilización de tipo-pLD209 a *P. grupo putida/V*. Se selecciona BA9605. **J.** Movilización de tipo-pLD209 a *P. aeruginosa* seguido de transposición del Tn6335 a un plásmido nativo de HV868.



Resultados y Discusión. Capítulo 2

III.2. Capítulo 2

Caracterización genética de plásmidos de la cepa clínica *Acinetobacter bereziniae* HPC229

III.2.1. Introducción

III.2.1.1. Plataformas genéticas portadoras de *bla*_{NDM-1} en *Acinetobacter bereziniae*

Acinetobacter es un género de bacterias aerobias Gram-negativas que se distribuyen ampliamente en la naturaleza, y muchos de sus miembros son patógenos oportunistas para el hombre (Peleg et al., 2008; Wong et al., 2016). A pesar de que la especie mayormente aislada de muestras clínicas de este género es *A. baumannii*, otras especies clínicas tanto como ambientales han sido también asociadas a infecciones nosocomiales (Peleg et al., 2008; Wong et al., 2016). Entre ellas *A. pittii* (Kishii et al., 2014), y *A. nosocomialis* (Kishii et al., 2014), y con menor frecuencia *A. lwoffii* (Hu et al., 2012), *A. junii* (Wong et al., 2016), *A. johnsonii* (Wong et al., 2016), *A. haemolyticus* (Wong et al., 2016), *A. schindleri* (Wong et al., 2016), *A. ursingii* (Wong et al., 2016; Faccone et al., 2019) y *A. bereziniae* (Kuo et al., 2010; Bonnin et al., 2012). Durante los últimos años aumentaron los reportes de cepas de *Acinetobacter* no-*baumannii* productoras de carbapenemasas, lo cual genera un escenario clínico complejo (Zhao y Hu et al., 2012). Dentro del grupo de las carbapenemasas existen dos familias de enzimas, las serino- β -lactamasas (S β Ls), así como por metalo- β -lactamasas (M β Ls) (Queenan y Bush, 2007). En particular, se reportaron más de 19 variantes de distintas familias de M β Ls en *Acinetobacter* spp., siendo prevalentes las de tipo-IMP, -VIM y -NDM (Zhao y Hu et al., 2012). *A. bereziniae* constituye un modelo de una especie clínico/ambiental de *A. no-baumannii* capaz de portar distintas M β Ls que incluye a IMP-1 (Lee et al., 2010; Cayo et al., 2018), IMP-5 (Grosso et al., 2015), IMP-19 (Yamamoto et al., 2013), VIM-2 (Lee et al., 2010), SIM-1 (Lee et al., 2010) y NDM-1 (Jones et al., 2015; Brovedan et al., 2015; Chagas et al., 2015). La extensa distribución de los genes codificantes de estas enzimas es debido a su asociación a diferentes EGM lo cual permiten su diseminación. Genes tipo-*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM-2} y *bla*_{SIM-1} se localizan en *A. bereziniae* en integrones tipo I (Lee et al., 2010; Yamamoto et al., 2013; Grosso et al., 2015) mientras que *bla*_{NDM-1} en un transposón compuesto (Jones et al., 2015). Además, en algunos casos fue estudiada la localización genómica de estos EG, *e.g.* integrones que portan *bla*_{VIM-2} y *bla*_{SIM-1} se ubican en cromosoma (Lee et al., 2010), mientras que integrones con *bla*_{IMP-5}, así como el transposón que contiene a *bla*_{NDM-1} se encuentran asociados a distintos plásmidos (Grosso et al., 2015; Jones et al., 2015). En este último

reporte, *bla*_{NDM-1} se halla dentro del transposón denominado Tn125, de 10.099 pb, compuesto por la estructura *ISAbal25-bla*_{NDM-1}-*ble-trpF-dsbC-cutA-groES-groEL-ISCR21-Δpac-ISAbal25* (Fig. I.7; Poirel et al., 2012), a su vez localizado en pNDM-40-1 de *A. bereziniae* CHI-40-1 (Jones et al., 2015). El Tn125, de localización plasmídica, fue hallado inicialmente en pNDM-BJ01 (47 kpb) y en pNDM-BJ02 (46 kpb), aislados de *A. lwoffii* WJ10621 y WJ10659, respectivamente (Hu et al., 2012). Estos plásmidos poseen un esqueleto (o “backbone”) idéntico formado por el gen *parA*, cuyo producto proteico está implicado en la segregación plasmídica, y una toxina tipo zeta del sistema TA tipo II, ambos correspondientes a la región de estabilidad, así como por el sistema de secreción tipo IV (SST4), que incluye los genes *virB1*, *virB2*, *virB4*, *virB5*, *virB6*, *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11*, *virD4*, *trg*, *traA*, *traC* y *traD*, del módulo de transferencia (Hu et al., 2012). Sin embargo, ambos plásmidos difieren en la región de adaptabilidad en el cual pNDM-BJ01 contiene el Tn125 completo mientras que pNDM-BJ02 porta el Tn125 incompleto debido a que carece de la segunda copia *ISAbal25* ubicada corriente abajo de *pac* (Fig. III.2.1; Hu et al., 2012). Años más tarde, se depositaron en bases de datos del NCBI (GenBank) otros 7 plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1} incluyendo pAB_499 de 47 kpb *A. pittii* D499 (Chen et al., 2012b), pNDM-AB de 47 kpb de *A. baumannii* GF2016 (Zhang et al., 2013), pXM1 de 47 kpb de *A. calcoaceticus* XN1570 (Sun et al., 2013), pAbNDM-1 de 48 kpb de *A. baumannii* (Wang et al., 2014), pM131_NDM-1 de 48 kpb de *Acinetobacter* sp. M131, y pNDM-Iz4b de 46 kpb *A. lwoffii* Iz4b y pNDM-40-1 de 45 kpb de *A. bereziniae* CHI-40-1 (Jones et al., 2015), mencionado anteriormente. El esqueleto o “backbone” de estos 7 plásmidos presentó elevada identidad nucleotídica respecto a pNDM-BJ01 mostrando algunas diferencias en la región de adaptabilidad conformada esencialmente por el Tn125 (Fig. I.7). Estas diferencias incluyen la delección de parte de *ble* e *ISCR27*, y carencia del gen *trpF* en pNDM-40-1; pérdida de la *ISAbal25* en el extremo 3' del Tn125 y adquisición en su lugar de *ISAbal1* en pM131_NDM-1 y pAB-D499; adquisición de una segunda copia de *ISAbal25* corriente abajo del Tn125 en pAbNDM; delección desde *cutA1* hasta *ISAbal25* y adquisición de los genes que confieren resistencia a macrólidos *msr(E)* y *mph(E)* en pNDM-AB (Jones et al., 2015). Por último, los plásmidos pXM1 y pNDM-Iz4b resultaron tener el Tn125 completo teniendo solo algunas mutaciones puntuales respecto a pNDM-BJ01 (Jones et al., 2015). Debido a que todos estos plásmidos presentan el mismo esqueleto que pNDM-BJ01, se los denominó en conjunto plásmidos tipo-pNDM-BJ01 (Jones et al., 2015). En este contexto, la caracterización de la plataforma genética portadora de *bla*_{NDM-1} en la cepa clínica local *A. bereziniae*, permitirá evaluar a este especie como probable reservorio de genes de resistencia, y dilucidar EGM

involucrados en la diseminación de un gen de resistencia emergente (Dortet et al., 2014) asociado prevalentemente a enterobacterias, y con menor frecuencia reportado al presente en Bacilos No Fermentadores. Además, el estudio comparativo de plásmidos con *bla*_{NDM-1} permitirá mostrar la evolución de plataformas asociadas al Tn125 en *Acinetobacter* spp. Así, este trabajo intenta aportar evidencias sobre los eventos genéticos involucrados en la diseminación de *bla*_{NDM-1} en especies ambientales que exhiben resistencia a carbapenemes, y pueden asociarse a hospedadores susceptibles, lo que puede conllevar a infecciones nosocomiales de importante morbi-mortalidad.

III.2.1.2. Plásmidos co-residentes, carentes de marcadores de resistencia a antimicrobianos, en *Acinetobacter bereziniae* HPC229

El advenimiento de la secuenciación masiva de genomas permitió detectar la diversidad de genes que se encuentran localizados en plásmidos (Slater et al., 2008) En particular, la mayoría de los plásmidos del género de *Acinetobacter* depositados en base de datos del NCBI (GenBank) corresponden a cepas clínicas de *A. baumannii*, siendo escasos al presente los reportados para otras especies del género. Asimismo, la mayoría de los genomas depositados de *Acinetobacter* no-*baumannii* están parcialmente ensamblados, lo cual complejiza la caracterización de los plásmidos. En un intento por evidenciar la diversidad plasmídica en *Acinetobacter* spp., se propusieron clasificaciones en base a marcadores plasmídicos, incluyendo replicasas, vinculadas al inicio de la replicación; así como relaxasas, involucradas en la movilización de estos EGM (Lean y Yeo, 2017; Salto et al., 2018). Las principales replicasas detectadas en el género corresponden a la superfamilia Rep-3 (pfam 01051), mientras que las relaxasas constituyen proteínas con dominio MobA/MobL (pfam03389) (Salto et al., 2018). Específicamente para *A. bereziniae*, el único plásmido caracterizado al presente es pNDM-40-1 de la cepa CHI-40-1 (Jones et al., 2015). Aun cuando Jones y cols. mostraron la existencia de otros plásmidos co-residentes para *A. bereziniae* CHI-40-1, los mismos no fueron caracterizados (Jones et al., 2015). Así, el repertorio y variedad de plásmidos presentes en *A. bereziniae* no ha sido aún estudiada, y el rol de los mismos en la supervivencia de este microorganismo en ámbitos clínicos/ambientales es desconocido. La caracterización de los plásmidos de la cepa clínica local HPC229, así como la evaluación comparativa con genomas de *Acinetobacter* spp., aportará evidencias de regiones homólogas, bajo la hipótesis del intercambio genético entre distintas especies dentro del género. Además, la detección y clasificación de replicasas y relaxasas identificadas en los genomas de *A. bereziniae* permitirá revelar la diversidad de plásmidos existentes en la especie. Por último, la

evaluación comparativa de los plásmidos de HPC229 contra los genomas de *A. bereziniae* aportará evidencia de las regiones plasmídicas expuestas a intercambio dentro de la especie. Así, el estudio del repertorio completo de los plásmidos de una especie o plasmidoma ofrece información relevante sobre la adaptación de patógenos oportunistas poco frecuentes como *A. bereziniae* al medio hospitalario.

III.2.1.3. Organización genética de los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229

Estudios recientes sugieren que los plásmidos presentan una estructura modular, siendo los genes codificantes de funciones relacionadas agrupados en segmentos específicos de la molécula de ADN (Thomas, 2000; Osborn y Boltner, 2002; Toussaint y Merlin, 2002; Smillie et al., 2010; Garcillán-Barcia et al., 2011). Se propuso que los distintos módulos presentes en diferentes plásmidos provienen de orígenes filogenéticos diversos y que los plásmidos se construyen mediante la yuxtaposición aleatoria de diferentes módulos funcionales (Osborn y Boltner, 2002; Toussaint y Merlin, 2002; Garcillán-Barcia et al., 2011). Los módulos contienen genes que cumplen con los roles esenciales para su supervivencia, como replicación, estabilidad, transferencia y adaptabilidad, siendo los primeros tres los que conforman el esqueleto del plásmido (Garcillán-Barcia et al., 2011). El módulo de replicación consiste en genes que codifican para replicasas y/o proteínas accesorias de la replicación y sitios de unión al ADN que permiten el inicio del proceso de replicación. Los genes involucrados en la estabilidad son aquellos que evitan la pérdida del elemento en su hospedador. Por otro lado, los genes pertenecientes al módulo de transferencia son aquellos que permiten la transferencia de los plásmidos a otros hospedadores. Por último, el módulo de adaptabilidad es aquel que alberga genes que confieren ventajas selectivas a un nicho en particular (Garcillán-Barcia et al., 2011), los cuales pueden estar asociados a distintos EG. Entre ellos se encuentran secuencias de inserción (IS), transposones (Tn), integrones (In) e islas genómicas (GI) (Patridge et al., 2018). Además, en los últimos años se han detectado diversas estructuras conteniendo genes de importancia biológica bordeadas por sitios XerC/D, sugiriendo que éstos están involucrados en la movilización de las mismas mediante eventos de recombinación sitio-específica (Blackwell y Hall, 2017; Mindlin et al., 2018; Cameranesi et al., 2018). Así, la caracterización y evaluación comparativa de las regiones modulares de los plásmidos de *Acinetobacter bereziniae* HPC229 permitirían comprender el origen, así como los eventos involucrados en la diseminación y/o intercambio de los módulos codificantes de características relevantes para persistir y sobrevivir a diferentes hospedadores y diferentes ambientes.

Este capítulo abordará:

- a. La caracterización del plásmido portador de *bla*_{NDM-1} en la cepa clínica local de *A. bereziniae* HPC229, pNDM229, identificación de sus regiones funcionales, y análisis comparativos contra estructuras homólogas de *Acinetobacter* spp bajo criterios evolutivos.
- b. La caracterización de los plásmidos co-residentes con pNDM229, incluyendo el análisis de su estructura modular, y la comparación genética de las regiones funcionales de los mismos contra genomas de *Acinetobacter* spp, con énfasis contra genomas de *A. bereziniae*.
- c. La clasificación de los plásmidos de HPC229, basada en la caracterización de sus replicasas y relaxasas.
- d. La identificación de plataformas genéticas plasmídicas flanqueadas por sitios tipo-XerC/D, sujetas a potenciales eventos de recombinación sitio-específica.

III.2.2. Resultados y Discusión

III.2.2.1. Plataformas genéticas portadoras de genes codificantes de MβLs en *Acinetobacter bereziniae*

Cepas de *Acinetobacter* no-*baumannii* productoras de MβLs han sido detectadas incluyendo las de tipo-IMP en *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. lwoffii*, *A. johnsonii*, *A. junii*, y *A. bereziniae* (Zhao y Hu, 2012), -VIM en *A. haemolyticus*, *A. pittii* y *A. bereziniae* (Zhao y Hu, 2012), SIM-1 en *A. pittii* y *A. bereziniae* (Zhao y Hu, 2012), y más recientemente NDM-1 en *A. lwoffii* (Hu et al., 2012), *A. johnsonii* (Feng et al., 2016), y *A. bereziniae* (Brovedan et al., 2015; Jones et al., 2015) así como NDM-14 en *A. lwoffii* (Wu et al., 2019). Uno de los objetivos específicos aquí planteados ha sido determinar las bases moleculares de mecanismos de resistencia a carbapenemes en especies no frecuentemente reportadas de *Acinetobacter*, incluyendo la caracterización de las plataformas genómicas portadoras de genes codificantes de las mismas, de manera de inferir probables mecanismos de diseminación de resistencia dentro del género. Para ello, se evaluó un aislamiento clínico resistente a carbapenemes proveniente de una paciente inmunodeprimida internada en un hospital público de Rosario, caracterizado como *A. lwoffii* HPC229 empleando el sistema VITEK-2. Los ensayos de susceptibilidad a diferentes antimicrobianos empleando VITEK-2, mostraron valores de CIMs (Tabla III.2.1) correspondientes a la categoría de resistente para ampicilina-sulbactama, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, piperacilina-tazobactama, imipenem, meropenem; intermedio para amikacina y susceptible a colistin, gentamicina, trimetoprima-sulfametoxazol y ciprofloxacina según CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2018). La cepa HPC229 exhibía ensayos preliminares microbiológicos que mostraron que era productora de una carbapenemasa inhibible por EDTA (ítem II.2.2, Mats. y Méts.), por lo cual fue derivada para la caracterización molecular de la MβL. Se abordó aquí la caracterización genética de la cepa HPC229, que incluye su identificación genotípica, la determinación de la plataforma genética portadora de la MβL y su localización genómica, como así también análisis comparativos de la misma contra bases de datos del NCBI (GenBank).

Tabla III.2.1. Susceptibilidad a agentes antimicrobianos de HPC229, de su derivada curada de plásmido (HPC229C1) y de la resultante de la transformación de HPC229C1 con extracto plasmídico de HPC229 (C1pNDM229)

Antimicrobianos	CIM($\mu\text{g/ml}$) ^a		
	HPC229	HPC229C1 ^c	C1pNDM ^c
Ampicilina-sulbactama	16	≤ 2	16
Ceftazidima	≥ 256	8	≥ 256
Cefotaxima	≥ 64	8	≥ 64
Cefepime	≥ 256	1	≥ 256
Piperacilina-tazobactama	≥ 128	8	≥ 128
Imipenem	128	0,125	128
Meropenem	≥ 16	1	≥ 16
Colistín	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
Gentamicina	1	1	1
Amikacina	2/32 ^b	32 ^b	32 ^b
Trimetoprima-sulfametoxazol	≤ 20	≤ 20	≤ 20
Ciprofloxacina	0,5	0,5	0,5

^aValores de CIM obtenidos por VITEK-2.

^bValores de CIM obtenidos según difusión en agar, por sugerencias de VITEK-2.

^cVer ítem III.2.2.3.3.2

III.2.2.2. Identificación de *A. bereziniae* HPC229 basada en marcadores moleculares

La identificación de especies de *Acinetobacter* mediante ensayos fenotípicos es imprecisa. Por ello, se emplearon diversos métodos genotípicos, entre ellos el análisis de la secuencia del ARNr 16S (Alvarez-Buylla et al., 2012). Sin embargo, numerosos reportes plantearon que la misma no es lo suficientemente polimórfica para distinguir especies en *Acinetobacter* siendo necesaria la complementación con otros marcadores (Alvarez-Buylla et al., 2012). Los métodos actuales de identificación molecular se basan en el análisis de las secuencias parciales del ARNr 16S y de genes “housekeeping” como *gyrB* y *rpoB* (Bonin et al., 2012; Ibrahim et al., 1997), que son más precisos para la asignación de especies (Vanechoutte et al., 2011). Estas metodologías han contribuido a una mejor comprensión de la epidemiología e importancia clínica de este género (Antunes et al. 2014). En este contexto, se realizó la caracterización del aislamiento en estudio mediante el análisis de las secuencias parciales del ARNr 16S, y de los genes *gyrB* y *rpoB* de acuerdo a lo propuesto (Bonin et al., 2012; Ibrahim et al., 1997). Además, se compararon las secuencias contra base de datos del NCBI (GenBank). Para ello, se realizaron PCRs específicas para cada uno de los genes (ítem II.3.4.1, Mats. y Méts.) empleando como templado muestras de ADN genómico extraído por equipos comerciales (ítem II.3.2, Mats. y Méts.), y los amplicones resultantes enviados a secuenciar (ítem II.6.1, Mats. y Méts.). El análisis de las secuencias parciales de ARNr 16S, *gyrB* y *rpoB* mostró identidades de 99,9%, 99,7%, y 99,8%; respectivamente, con los

ortólogos de *A. bereziniae* CIP 70.12 (KP765739.1, KP765740.1 y KP765741.1). Estos resultados permitieron reclasificar al aislamiento como *A. bereziniae*. Esta especie, antes denominada *Acinetobacter* genomoespecie 10, fue recientemente denominada (Nemec et al., 2010), y reportes actuales indican que se encuentra en numerosos nichos ambientales así como en materiales clínicos de pacientes vulnerables (Grosso et al., 2015).

El análisis de las secuencias de los marcadores moleculares de HPC229 permitió asignar correctamente la especie a la cual pertenece. El hallazgo de una cepa escasamente reportada al presente como *A. bereziniae* motivó la búsqueda de genomas de esta especie en la base de datos del NCBI (GenBank). Hasta el momento de la identificación de HPC229 en el laboratorio, solo se contaba con 4 genomas de *A. bereziniae* disponibles, correspondientes a las cepas clínicas CIP 70.12, KCTC 23199, NIPH 3 y CHI-40-1. Entre ellos, CHI-40-1, aislada de una paciente internada en India, es la única que presentaba resistencia a carbapenemes debido a la presencia del gen *bla_{NDM-1}* de localización plasmídica (Jones et al., 2014; Jones et al., 2015). La portación de genes codificantes de MβLs de HPC229 y CHI-40-1 impulsó inicialmente a la comparación de los marcadores genéticos de ambas cepas. Para ello, se analizaron las secuencias parciales de ARNr 16S, *gyrB* y *rpoB* de ambas cepas. El resultado de los alineamientos de estas secuencias mostró identidades menores al 100% (99,9%, 99,8%, y 99,6%; respectivamente), sugiriendo que ambas son distintas. Por lo tanto, HPC229 es otra cepa de *A. bereziniae* portadora de MβL no epidemiológicamente relacionada con la emergente en India. El creciente reporte de cepas de *A. bereziniae* aisladas en ambientes nosocomiales motivó a proponer que constituiría una nueva especie patógena emergente (Grosso et al., 2015).

III.2.2.3. Estudio de la plataforma genética responsable de la diseminación de *bla_{NDM-1}*

Numerosos estudios demostraron que los genes codificantes de la mayoría de las MβLs adquiridas en *Acinetobacter* spp. (IMP, VIM, SIM y SPM) se hallan asociados mayoritariamente a integrones de clase 1, los cuales a su vez se integran a plataformas genéticas móviles como transposones y/o plásmidos, que se diseminan luego por THG (Poirel et al., 2006). Por otra parte, la movilización de *bla_{NDM}* en *Acinetobacter* spp está principalmente asociada a transposones insertos en cromosomas, y en numerosos casos a plásmidos de amplio rango de hospedador, lo cual permitió la profusa diseminación a nivel mundial (Dortet et al., 2014). En este contexto, parte de los objetivos específicos ha sido la caracterización de la MβL involucrada en la resistencia a carbapenemes en el aislamiento clínico *A. bereziniae* HPC229, el estudio de su entorno genético, y su localización genómica. Esto permitirá evaluar las estructuras genéticas de diseminación del gen, así como proveer evidencias de los eventos genéticos involucrados en su diseminación.

III.2.2.3.1. Caracterización del gen codificante de la MβL

Cepas clínicas de *A. bereziniae*, al presente, han sido reportadas como productoras de MβLs incluyendo las variantes IMP-1, IMP-5, IMP-19, VIM-2, SIM-1, NDM-1 (Lee et al., 2010; Yamamoto et al., 2013; Jones et al., 2015; Grosso et al., 2015). Bajo el objetivo de identificar la enzima producida por *A. bereziniae* HPC229 se realizaron ensayos de PCR con cebadores específicos para la detección de genes codificantes de MβL prevalentes, incluyendo las familias *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{SPM}* y *bla_{NDM}*, empleando como templado ADN genómico (ítem II.3.2, Mats. y Méts.). El único amplicón obtenido luego de la corrida electroforética (ítem II.3.5, Mats. y Méts.) fue el resultante de la PCR con cebadores para *bla_{NDM}*. La secuenciación y análisis de secuencia reveló que HPC229 porta *bla_{NDM}*, gen codificante de una MβL reportada por primera vez en 2009 en una cepa de *K. pneumoniae* (Yong et al., 2009).

Así, la identificación genotípica de *bla_{NDM}* en HPC229 condujo a reportar el primer aislamiento de *A. bereziniae* productor de NDM en América y el segundo de esta especie reportada en el mundo (Jones et al., 2015). Por otro lado, en Argentina solo se había reportado la presencia de cepas clínicas productoras de NDM en *P. rettgeri* (Pasteran et al., 2014), siendo así HPC229 la primera cepa de un BNF portadora de *bla_{NDM}* en el país (Brovedan et al., 2015).

III.2.2.3.2. Caracterización del entorno genético inmediato de *bla_{NDM-1}*

El entorno genético inmediato de otras plataformas reportadas en *Acinetobacter* spp. (y también en enterobacterias) mostraban que *ISAbal25* se encuentra corriente arriba de *bla_{NDM}* (Pfeifer et al., 2011; Hu et al., 2012; Poirel et al., 2012); IS reportada por primera vez por nuestro grupo de trabajo (Mussi et al., 2005). El análisis del entorno genético inmediato mediante PCR específica usando los cebadores *ISAbal25-D* y *NDM-R* (Tablas II.1 y II.2) confirmó la presencia de *ISAbal25* corriente arriba de *bla_{NDM}*. Posteriormente, el entorno genético de ambos elementos se evaluó mediante ensayos de clonado y secuenciación. Para ello, se purificó ADN genómico de HPC229 (ítem II.3.2, Mats. y Méts.) y se efectuaron digestiones con *EcoRI* (ítem II.3.6, Mats. y Méts.). Los fragmentos obtenidos fueron ligados en el vector pSU18 y la mezcla de ligación empleada para transformar *E. coli* DH5α (ítem II.4.1, Mats. y Méts.). Luego, se seleccionaron colonias con doble resistencia a ceftazidima y cloranfenicol (ítem II.3.2, Mats. y Méts.). Las colonias resistentes a ambos antibióticos obtenidas (8 en total), fueron utilizadas para la purificación de plásmidos (ítem II.3.1, Mats. y Méts.) bajo el objetivo de evaluar el vector con el inserto de interés. Se realizaron digestiones de los vectores purificados con la enzima descripta, y se chequeó el tamaño de los fragmentos obtenidos (no mostrado). Este análisis arrojó que todas las colonias poseían vectores con

insertos aproximados de 1.000 pb, y uno de ellos fue enviado a secuenciar. Dicha secuencia mostró un tamaño de 1.053 pb e incluyó la secuencia completa de *bla_{NDM}* (813 pb) y regiones parciales de la IRr (repetición invertida derecha) correspondiente a *ISAbal25* (10 pb), corriente arriba de *bla_{NDM}*, y de *ble* (136 pb), corriente abajo. Este último gen codifica para una proteína que confiere resistencia a bleomicina, una molécula glicopeptídica antitumoral. Reportes recientes han mostrado que los genes *bla_{NDM}* y *ble* constituyen un operón que se expresa constitutivamente (Dortet et al., 2017). Los resultados totales mostraron la secuencia completa de *bla_{NDM}*, variante alélica *bla_{NDM-1}*, y su entorno genético cercano, que incluye *ISAbal25* y *ble*, corriente arriba y abajo, respectivamente. El análisis comparativo de este fragmento mostró que el entorno genético inmediato del gen de interés es similar a lo reportado en los plásmidos tipo- pNDM-BJ01, que incluye a pNDM-BJ01 de *A. lwoffii* (Hu et al., 2012), y pNDM-40-1, de *A. bereziniae* CHI-40-1 (Jones et al., 2015). Este resultado permitió hipotetizar que la plataforma correspondería al TnI25 (Fig. II.7) (Hu et al., 2012; Jones et al., 2015), y debe evaluarse entonces la presencia de dicho transposón, y si su localización es plasmídica o cromosomal.

III.2.2.3.3. Localización del gen codificante de NDM

Las plataformas portadoras del gen *bla_{NDM-1}* de cepas de *Acinetobacter* spp, que corresponden a la secuencia total o parcial de TnI25, se encuentran mayoritariamente localizadas en plásmidos conjugativos de aproximadamente 47 kpb (Hu et al., 2012; Jones et al., 2014; Jones et al., 2015; Zhou et al., 2015), aunque excepcionalmente el gen se localiza en TnI25 inserto en cromosoma de cepas de *A. baumannii* (Pfeifer et al., 2011; Poirel et al., 2012). La evaluación de la localización de *bla_{NDM-1}* se efectuó empleando diferentes ensayos de transferencia de ADN así como ensayos de curado de plásmidos.

III.2.2.3.3.1. Evidencias de localización plasmídica de *bla_{NDM-1}*

Los genes codificantes de NDM-1 se hallan en *Acinetobacter* spp frecuentemente asociados a plásmidos (Dortet et al., 2014). En este contexto, se realizaron inicialmente ensayos de transferencia de ADN (Marchiaro et al., 2014A), incluyendo transformación y conjugación (ítems II.4.1, II.4.2 y II.4.3, Mats. y Méts.).

Se efectuaron para ello extracciones de ADN plasmídico de cultivos de HPC229 empleando diferentes métodos incluyendo así, equipos comerciales o lisis alcalina (ítem II.3.1, Mats. y Méts.) bajo la idea de comparar el rendimiento de cada uno. La comparación de los perfiles electroforéticos obtenidos para ambas purificaciones muestra tres bandas comunes (puntas de flecha celeste, Fig. III.2.1), y cuatro adicionales solo observadas empleando lisis alcalina (puntas de flecha negra, calle 1, Fig. III.2.1). Este resultado muestra que este último produce un mayor rendimiento del contenido plasmídico. Así, bandas

indicadas con puntas de flecha negra y celeste (Fig. III.2.1) podrían corresponder a distintos plásmidos, o bien a formas topológicas de los mismos.

Los extractos obtenidos del método de lisis alcalina, en consecuencia, se utilizaron en ensayos de transformación, incluyendo transformación química y electrotransformación, empleando *E. coli* DH5 α , *A. baumannii* ATCC 17978 o *A. baylyi* ADP1 (Vanechoutte et al., 2006) sensibles a β -lactámicos, como bacteriasceptoras (ítems II.4.1 y II.4.2, Mats. y Méts.). Estos ensayos no permitieron obtener transformantes en ningún caso. Posteriores experimentos de conjugación bipartita utilizando como aceptoras *E. coli* DH5 α , *P. aeruginosa* PAO1 o *A. baumannii* ATCC 17978 resistentes a rifampicina (ítem II.4.3.1, Mats. y Méts.) fueron efectuados para evaluar la localización de *bla*_{NDM-1} en un plásmido conjugativo. Estos experimentos no permitieron obtener transconjugantes con ninguna de las aceptoras en las condiciones utilizadas. Por último, bajo la hipótesis de que el gen de interés se encuentra en un plásmido movilizable, se efectuaron ensayos de conjugación tripartita (ítem II.4.3.2, Mats. y Méts.) utilizando *E. coli* HB101 poseedora de un plásmido “helper”, HPC229 como probable aceptora del “helper”, y *E. coli* DH5 α resistente a rifampicina como aceptora del plásmido movilizable portador de *bla*_{NDM-1}. Estos ensayos no permitieron obtener transconjugantes. Por tanto, los ensayos de transferencia de ADN empleados, efectuados por duplicado, no permitieron dilucidar la localización plasmídica del gen de interés. En este contexto, los resultados sugieren que *bla*_{NDM-1} de *A. bereziniae* HPC229 podría estar en cromosoma, y/o codificado en un plásmido no movilizable, o no replicativo en las cepas aceptoras utilizadas; lo cual podría dar indicios de un plásmido diferente al reportado para *Acinetobacter* spp. (Hu et al., 2012; Jones et al., 2015).

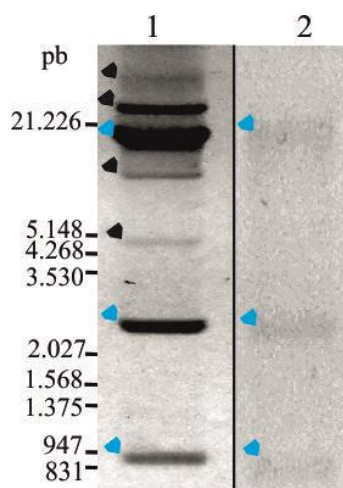


Figura III.2.1. Electroforesis en geles de agarosa de extractos plasmídicos de *A. bereziniae* HPC229 según diferentes métodos de purificación. Calle 1: extracto plasmídico obtenido empleando lisis alcalina; calle 2: extracto plasmídico obtenido empleando sistemas comerciales. Puntas de flecha celeste, bandas en común por ambos métodos; puntas de flecha negra: bandas adicionales observadas empleando lisis alcalina. A la izquierda, marcador de tamaño molecular (pb), ADN λ digerido con *EcoRI* y *HindIII*.

III.2.2.3.3.2. Confirmación de localización plasmídica de *bla*_{NDM-1}

Los plásmidos son mayoritariamente moléculas estables y pueden ser mantenidos en las comunidades bacterianas al ser distribuidos a cada célula durante la división celular (Trevors, 1986). Sin embargo, en algunos casos las células hospedadoras pueden sufrir pérdida espontánea de los plásmidos durante el proceso de segregación plasmídica (Trevors, 1986). Teniendo en cuenta esto, se han reportado diversos agentes (*e.g.* bromuro de etidio, SDS) o procedimientos (*e.g.* elevada temperatura) para incrementar la frecuencia de segregación plasmídica errónea de las células (Trevors, 1986). En este contexto, y bajo el objetivo de proveer evidencias de la localización plasmídica de *bla*_{NDM-1} se efectuaron ensayos de curado de plásmidos empleando una combinación de elevada temperatura (40°C) y presencia de un agente desestabilizante de membrana como SDS, siguiendo sugerencias de algunos autores (Lopes et al., 2012).

Para ello, un cultivo de *A. bereziniae* HPC229 se inoculó en caldo LB conteniendo SDS y se incubó a 40°C durante 48 horas (ítem II.4.4, Mats. y Méts.). Después de la incubación, alícuotas de la suspensión bacteriana fueron transferidas a placas de LB agar, y cada colonia desarrollada repicada simultáneamente en placas de LB agar con presencia y ausencia de ceftazidima. El desarrollo de colonias en LB agar sin antibiótico, que no se evidencia en la placa selectiva permite hipotetizar que dichas colonias han sido curadas del plásmido portador del gen de resistencia. Este procedimiento permitió aislar 5 bacterias sensibles a ceftazidima, sospechosas de haber sido curadas (C) del plásmido, denominadas por ello HPC229C1, HPC229C2, HPC229C3, HPC229C4 y HPC229C5. Se efectuaron inicialmente como controles ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos (ítem II.2.1, Mats. y Méts.) de los clones en estudio, y de la cepa parental como control. Los valores de CIMs para HPC229C1, clon representativo del conjunto de curadas, evidenciaron la pérdida de resistencia a ampicilina-sulbactama, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, piperacilina-tazobactama, imipenem y meropenem. Estos resultados muestran clones sensibles a β -lactámicos evidenciando así que *bla*_{NDM-1} se encontraría localizado en plásmido. La confirmación de la pérdida de *bla*_{NDM-1} en las 5 colonias curadas se realizó mediante PCR con cebadores específicos (NDM-D/R, Tablas II.1 y II.2, Mats. y Méts.) usando ADN genómico purificado (ítem II.3.2, Mats. y Méts.) de cada colonia, y de la parental, como control. Los resultados mostraron ausencia de amplicones para los aislamientos bacterianos curados de plásmido. Por otro lado, bajo el objetivo de confirmar que las colonias curadas sensibles a los β -lactámicos son clonales respecto a la parental, se compararon los perfiles de amplificación obtenidos por OD-PCR (ítem II.3.4.2, Mats. y Méts.) utilizado como metodología genotípica

(Limansky et al., 2002). Para ello, se realizaron extracciones genómicas (ítem II.3.2, Mats. y Méts.) de HPC229 y HPC229C1, como clon representativo de las cepas curadas. Los perfiles de amplificación por OD-PCR de ambas cepas resultaron ser iguales (Fig. III.2.2) mostrando la identidad de las mismas.

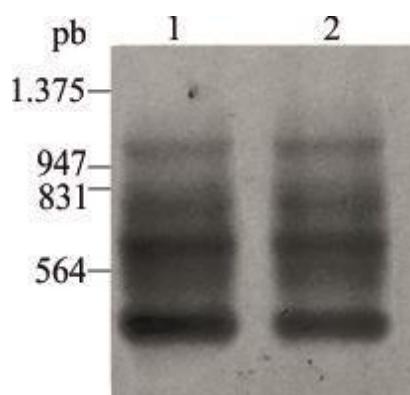


Figura III.2.2. Perfiles de amplificación de HPC229 y su derivada curada (HPC229C1) mediante OD-PCR/19. Calle 1: HPC229; calle 2: HPC229C1. A la izquierda, marcador de tamaño molecular (pb), ADN λ digerido con *EcoRI* y *HindIII*.

La falla en los resultados de transferencia del plásmido portador del gen de resistencia, incluyendo la conjugación bi- o tri-partita, así como transformación, empleando en dichos experimentos diferentes especies bacterianas como aceptoras, motivaron el ensayo de transformación de dicho plásmido a su hospedador natural, curado de dicho plásmido, *i.e.* HPC229C. Bajo este objetivo, se realizaron ensayos de electrotransformación de HPC229C1 (ítem II.4.2, Mats. y Méts.), tomada arbitrariamente entre los clones sensibles a carbapenemes, empleando el contenido plasmídico total de HPC229 (ítem II.3.1, Mats. y Méts.). La selección de bacterias transformadas en medio LB sólido suplementado con ceftazidima (ítem II.4.2, Mats. y Méts.), permitió aislar numerosas colonias resistentes a este antibiótico. Se seleccionó un clon transformante (C1-pNDM) y se efectuaron ensayos de sinergia (ítem II.2.2, Mats. y Méts.), como PCR con cebadores específicos de NDM (NDM-D/R, Tablas II.1 y II.2, Mats. y Méts.) bajo el objetivo de confirmar la portación de la M β L. Los resultados permitieron confirmar que la resistencia es debida a la presencia de M β L, y por otro lado que su gen codificante es *bla*_{NDM-1}. Finalmente, para confirmar el mismo perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de C1-pNDM respecto a la cepa parental se analizaron los valores de CIMs empleando VITEK-2 (Tabla III.2.1). Los valores hallados muestran que tanto HPC229 como C1-pNDM presentan el mismo perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos ensayados confirmando que el plásmido con *bla*_{NDM-1} es el responsable de la resistencia a los β -lactámicos.

Finalmente, aun cuando han fallado los ensayos iniciales de transferencia de ADN empleando el extracto purificado de la cepa parental (ítem III.2.2.3.3.1), pudo evidenciarse la

portación plasmídica de *bla_{NDM-1}*, mediante la recuperación de cepas curadas (e.g. HPC229C1) sensible a carbapenemes en ensayos de curado de plásmidos, y la recuperación subsiguiente de C1-pNDM resistente a dichos antibióticos según ensayos de electrotransformación.

III.2.2.3.4. Análisis plasmídico de HPC229 *in silico*

La secuenciación masiva de los genomas bacterianos se ha incrementado enormemente en los últimos años proporcionando una herramienta valiosa para abordar el conocimiento de la biología bacteriana y facilitando la identificación de los EGM portadores de genes de resistencia (Peleg et al., 2008; Wright et al., 2014; Evans y Amyes, 2014; Antunes et al. 2014). Bajo el objetivo de obtener la secuencia completa del plásmido portador de *bla_{NDM-1}* se planteó la estrategia de secuenciar el genoma completo de la cepa HPC229. Para ello, el contenido genómico fue enviado a secuenciar (FLX 454-ROCHE, Servicio de Secuenciación, INDEAR, ítem II.6.2, Mats. y Méts.).

III.2.2.3.4.1. Análisis de la secuencia del plásmido portador de *bla_{NDM-1}*

La pirosecuenciación de los genomas permite obtener las secuencias cromosómicas como así también las correspondientes a plásmidos (Onmus-Leone et al., 2013). Aun así, el ensamblado de las secuencias nucleotídicas de cada replicón de la bacteria es verdaderamente un desafío. Bajo el objetivo de identificar el plásmido que contiene *bla_{NDM-1}*, análisis *in silico* empleando diversas herramientas informáticas fueron efectuados a partir de los datos obtenidos de la secuenciación (ítem II.6.2, Mats. y Méts.).

En primer lugar, se efectuó la identificación del gen de interés (*bla_{NDM-1}*) depositando los 134 contigs en el servidor de anotación genómica automática RAST (ítem II.7.2, Mats. y Méts.) ya que permite predecir la función de cada uno de los marcos de lectura (orfs). El análisis de los datos obtenidos por este servidor permitió identificar el contig 49 de 33 kpb que contiene a *bla_{NDM-1}*. En segundo lugar, se planteó la posibilidad de que la secuencia completa del plásmido pueda estar formada por varios contigs. Para confirmar esta hipótesis, se realizaron búsquedas de homología del contig 49 contra base de datos del NCBI (GenBank) mediante BlastN, utilizando luego de molde el plásmido de mayor identidad seleccionado para la búsqueda de posibles contigs faltantes en el genoma de HPC229. El contig 49 mostró 99% de identidad nucleotídica y una cobertura de 98% contra una región del plásmido pNDM-BJ01. Este último, de 47 kpb, fue aislado de la cepa clínica *A. lwoffii* WJ10621, siendo el primer plásmido conjugativo portador de *bla_{NDM-1}* reportado en *Acinetobacter* (Hu et al., 2012). En base a la estrategia arriba detallada, la secuencia de pNDM-BJ01 fue utilizada como molde para identificar regiones homólogas en los restantes

contigs del genoma de HPC229. Este análisis permitió identificar 4 contigs adicionales (#78, 98, 108 y 133) que completarían el plásmido de HPC229. Los contigs #78 (8 kpb), #98 (1.2 kpb) y #108 (584 pb) mostraron 100% de cobertura con el plásmido molde, siendo la identidad nucleotídica de 100%, 99% y 99%, respectivamente. El contig #133 (121 pb) se encuentra en dos regiones de pNDM-BJ01 con 100% de cobertura e identidad. Estos resultados sugieren que el mencionado contig estaría presente dos veces en el plásmido. Así, pudieron ensamblarse putativamente 5 contigs que dan como resultado un plásmido de 44.560 pb en la cepa *A. bereziniae* HPC229 (Fig. III.2.3). Las uniones predichas de los siguientes contigs, #49-133-108-133-78, deducidos de los análisis comparativos con pNDM-BJ01 fueron finalmente confirmadas mediante PCR/secuenciación con cebadores diseñados para tal fin (Fig. III.2.3; 229P1-D/229P1-R, Tablas II.1 y II.2, Mats. y Méts.). Es de destacar que la secuencia de 121 pb del contig #133 se encuentra duplicada tanto para el plásmido de la cepa local como para pNDM-BJ01 mostrando como una debilidad de la pirosecuenciación, la de generar contigs como únicos (*e.g.* #133), que sin embargo, podrían estar presentes en más de un sitio genómico.

Estos análisis *in silico* permitieron obtener la secuencia completa del plásmido portador de *bla*_{NDM-1} denominado pNDM229 (Brovedan et al., 2015). El mismo fue depositado en el NCBI (GenBank) siendo el número de acceso KT072713.1.

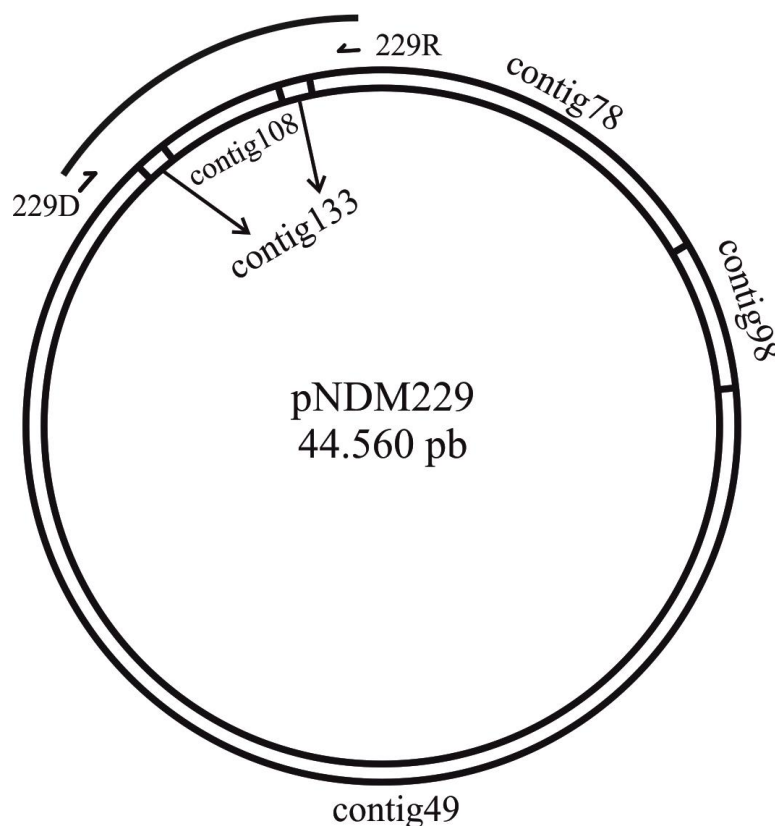


Figura III.2.3. Representación esquemática de pNDM229 que muestra el ensamblaje *in silico* de los contigs obtenidos por pirosecuenciación. Las uniones predichas fueron confirmadas por PCR.

III.2.2.3.4.2. Caracterización de pNDM229

La secuenciación completa de los EGM portadores de genes de resistencia proporciona información valiosa para el análisis de sus plataformas y para una mejor comprensión de la diseminación de los determinantes de resistencia (Hu et al., 2012). Los primeros plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1} derivaron de enterobacterias (Yong et al., 2009; Ho et al., 2011; Poirel et al., 2011; Sekizuka et al., 2011) mientras que plásmidos de *Acinetobacter* spp. fueron posteriormente reportados (Hu et al., 2012; Jones et al., 2015; Brovedan et al., 2015). Bajo la idea de que plataformas móviles como los plásmidos constituyen la base racional de la diseminación por THG de MβLs prevalentes en el mundo, como *bla*_{NDM-1}, se abordó la caracterización molecular de la maquinaria de movilización de este determinante de resistencia. La descripción del mismo se basó en la caracterización de las regiones modulares que contienen genes codificantes de proteínas con funciones asociadas a la replicación, estabilidad, transferencia y adaptabilidad, de acuerdo al esquema propuesto (Garcillán-Barcia et al., 2011). Para ello, se utilizaron herramientas bioinformáticas (ítem II.7, Mats. y Méts.) y análisis comparativos contra la base de datos del NCBI (GenBank) para dilucidar la profusa diseminación de este marcador de resistencia en el género de *Acinetobacter*.

El plásmido pNDM229, cuyo contenido G+C es de 40,8 %, contiene 53 marcos de lectura abierta (orfs) de los cuales 31 codifican para proteínas con funciones conocidas y las restantes 22 son proteínas hipotéticas con funciones no reportadas de acuerdo a los análisis de RAST y BlastP (Fig. III.2.4; Tabla A.2, Anexos). Genes con funciones predichas correspondientes a la región de estabilidad incluyen *parA* (pfam13614) y *parB* (pfam02195) codificantes de proteínas vinculadas con la segregación plasmídica identificados mediante BlastX, Pfam (ítem II.7.3, Mats. y Méts.); y *zeta toxin* (pfam06414) cuyo producto proteico es una toxina del sistema TA tipo II (Jurenaite et al., 2013), mediante TADB (ítem II.7.3, Mats. y Méts.). Es de destacar que los 3 genes no se encuentran contiguos entre ellos (Fig. III.2.4) sugiriendo que fueron adquiridos en distintos eventos de THG.

Se identificaron numerosos genes codificantes del SST4 involucrados en la transferencia del plásmido mediante conjugación (Fig. III.2.4; Tabla A.2). Los productos proteicos de los genes detectados presentan funciones descriptas previamente (ítem I.4.2.1.2). Entre ellos, se identificaron las secuencias completas de *virB1* (pfam01464), *virB2* (pfam04956), *virB4* (pfam03135), *virB5* (pfam07996), *virB6* (pfam04610), *traA* (pfam03389, pfam13604 y pfam01443), *traC* (pfam13166) y *traD* (pfam06412). Por otra parte, se identificaron secuencias parciales de los genes *virB8* (pfam04335), *virB11* (pfam00437),

virD4 (pfam10412) y *trg* (pfam01464), y la ausencia de *virB9* y *virB10*. Es de destacar que no se detectó el codón de terminación de la transcripción de *trg*, como así tampoco el codón de inicio de la transcripción del gen *virD4*, lo cual aportan evidencias de una delección que incluye el final de *trg*, *virB9* y *virB10* completos, y el comienzo de *virD4*. Dado que *trg* y *virD4* se encuentran contiguos en un mismo marco de lectura (Fig. III.2.4), los análisis bioinformáticos predicen una proteína hipotética compuesta por la fusión de las regiones N-terminal de Trg y C-terminal de VirD4 (Fig. III.2.4; Tabla A.2).

Bajo el objetivo de identificar el sitio de inicio de la transferencia u *oriT* se procedió al análisis de la región corriente arriba del gen codificante de la relaxasa *traA* según lo sugerido (Francia et al., 2004). Para ello, los 454 pb (desde 44.302- 44560, y desde 1-196) ubicados entre los genes *traD* y *traA* (Fig. III.2.4) fueron analizados comparativamente mediante BlastN contra base de datos del NCBI (GenBank). Los resultados muestran que los 454 pb exhiben 100% tanto de identidad nucleotídica como de cobertura con pNDM-40-1, plásmido aislado de *A. bereziniae* CHI-40-1, cuyo sitio *oriT* ha sido profusamente estudiado (Jones 2015 et al., 2015). En este trabajo se mostró que el sitio de inicio de transferencia, de 38 pb, se ubica 196 pb corriente arriba de *traA*. El mismo está compuesto por un sitio *nic* adyacente a dos repeticiones invertidas imperfectas, característico de la familia de *oriTs* de plásmidos cuyas relaxasas corresponden a la sub-familia MOB_Q (Francia et al., 2004; Jones et al., 2015). Así, el sitio *oriT* en pNDM229 (Fig. III.2.4), homólogo de pNDM-40-1, se ubica entre los nt 1-38 corriente arriba de *traA*, que inicia en el nt 196 (Tabla A.2).

Los resultados en conjunto revelan que el SST4 está defectivo debido a la fusión putativa entre *trg* y *virD4*, y por estar deletados parte de *virB8* y *virB11*; e incompleto, por la ausencia de *virB9* y *virB10*; observaciones que explicarían la falla de los ensayos de conjugación (ítem III.2.2.3.3.1). Aun así, la identificación del gen codificante de la relaxasa TraA y del sitio *oriT* sugieren que pNDM229 podría ser movilizado. Sin embargo, su movilización podría ser efectiva por un plásmido “helper” distinto al empleado en los ensayos de conjugación tri-partita de este trabajo, dada la falla en obtener transconjugantes en las condiciones usadas (ítem III.2.2.3.3.1).

La región de adaptabilidad de pNDM-BJ01, el primer plásmido reportado en *Acinetobacter* spp., mostró que *bla*_{NDM-1} se encuentra inserto dentro del Tn125 (Hu et al., 2012). El mismo comprende una estructura conformada por los siguientes elementos, *ISAbal25-bla*_{NDM-1}-*ble-trpF-dsbC-cutA-groES-groEL-ISCR21-Δpac-ISAbal25* (Fig. I.7) conformando así un transposón compuesto de 10.099 pb (Poirel et al., 2012). Además, mientras que el contenido G+C del Tn125 es de 57,9 %, el de pNDM-BJ01 es de 40%, lo cual sugiere que el transposón tiene un origen distinto (Hu et al., 2012). Este transposón ha sido

inicialmente detectado en el cromosoma de la cepa clínica *A. baumannii* 161/07 interrumpiendo un gen denominado *msf*, codificante de un transportador de membrana (Pfeifer et al., 2011). En esa cepa, se detectaron las repeticiones directas (DR) de 3 pb bordeándolo, evidenciando su adquisición reciente (Pfeifer et al., 2011). Otros autores detectaron el mismo EGM en cepas clínicas de *Acinetobacter* spp. tanto en cromosoma (Poirel et al., 2011) como en plásmidos (Hu et al., 2012; Yang et al., 2012; Zong et al., 2013; Zhou et al., 2015; Jones et al., 2015; Brovedan et al., 2015; Zou et al., 2017). Estas observaciones llevaron a proponer que el Tn125 sería uno de los responsables esenciales de la diseminación de *bla*_{NDM-1} en *Acinetobacter* spp. y en *Enterobacteriaceae* (Pfeifer et al., 2011; Poirel et al., 2011; Bontron et al., 2016). En este contexto, se expuso anteriormente que se identificaron IS*Aba125* y *ble*, corriente arriba y abajo de *bla*_{NDM-1}, respectivamente (ítem III.2.2.3.2). Bajo el objetivo de evaluar si en pNDM229 la estructura IS*Aba125*-*bla*_{NDM-1}-*ble* se encuentra inserta dentro del Tn125 se procedió al análisis del entorno de la misma a través de BlastX y Pfam (ítem II.7.3, Mats. y Méts.). Los resultados de los análisis permitieron revelar la presencia de los genes *trpF*, *dsbC*, *cutA*, *tnpA* (ISCR21), *groES* *groEL*, Δ *pac*, *tnpA* (IS*Aba125*) corriente abajo de *ble* (Fig. III.2.4; Tabla A.2). De esta manera se pudo confirmar que el Tn125 se encuentra inserto dentro de pNDM229. El mismo contiene las mismas RD de 3 pb (GTT) que en pNDM-BJ01 y pNDM-40-1 (Hu et al., 2012; Jones et al., 2015) revelando su adquisición reciente (Fig. III.2.4). Además, se identificaron los genes *aphA6*, que confiere resistencia a aminoglucósidos, corriente arriba del Tn125, y *tnpR*, codificante de una resolvasa de la familia de la serín-recombinasas involucrada en la resolución de multímeros (Smith et al., 2002), corriente abajo del Tn125 (Fig. III.2.4; Tabla A.2). Es importante aclarar que se reportó que *aphA6* no se estaría transcribiendo debido a la pérdida del promotor (Hu et al., 2012), por lo que este gen no estaría involucrado en la resistencia a amikacina en HPC229 (Tabla III.2.1). Por último, cinco secuencias de inserción localizadas en el entorno cercano del Tn125 (Fig. III.2.4) fueron identificadas mediante ISFinder y BlastX (ítems II.7.3 y II.7.6, Mats. y Méts.). Entre ellas, las dos copias de IS*Aba125* ubicadas una corriente arriba de *bla*_{NDM-1} y la segunda corriente abajo de Δ *pac* (Fig. III.2.4) y la secuencia de inserción de tipo ISCR (por “rolling circle”), ISCR21 corriente abajo de *groEL*, mencionadas anteriormente, y dos copias IS*Aba14*, una corriente arriba de *aphA6* y la segunda corriente abajo de la segunda copia de IS*Aba125* (Fig. III.2.4). Ambas IS*Aba125* presentan 99% de identidad con la secuencia homóloga depositada en la base de datos de ISFinder (ISSaga), mientras que la IS*Aba14* ubicada corriente arriba de *aphA6* presentó 99% de identidad nucleotídica contra la IS*Aba14* de la base de datos ISSaga, y la segunda copia, corriente abajo de IS*Aba125* solo un 94%, por lo cual hemos denominado a esta última tipo-IS*Aba14* (Fig. III.2.4). Ha sido interesante notar que entre todas las IS detectadas, solo el elemento tipo-IS*Aba14* presenta

repeticiones directas (DR), lo cual sugiere su reciente adquisición. Además, tanto pNDM229 como pNDM-BJ01 y pNDM-40-1 presentan la copia de *ISAbal4* corriente arriba de *aphA6*, gen ubicado corriente arriba del *TnI25* (Fig. III.2.4). Sin embargo, en pNDM229, hay una segunda copia de *ISAbal4* (tipo-*ISAbal4*) en la región inmediata corriente abajo del *TnI25* (Fig. III.2.4; Brovedan et al., 2015). Esta característica distingue a pNDM229 de los plásmidos reportados al presente y sugiere la selección de un nuevo transposón compuesto flanqueado por dos *ISAbal4* (Fig. III.2.4). Bajo el objetivo de determinar si el transposón putativo de 14.060 pb que incluye *ISAbal4-aphA6-TnI25-tipo-ISAbal4* es único, se usó la secuencia completa de este elemento como “query” para la búsqueda de homología mediante BlastN contra la base de datos del NCBI (GenBank). El resultado de este análisis mostró que este transposón no se encuentra presente en las secuencias depositadas al presente. Estudios recientes mostraron la capacidad de *ISAbal4* para formar transposones con capacidad de movilizarse vía transposición (Bonin et al., 2012). Ejemplo de ello es el transposón compuesto *Tn2114* compuesto por una *ISAbal4*, el gen *bla_{CARB-14}* codificante de una β -lactamasa de tipo A y una *ISAbal21*. Este elemento se lo identificó en la cepa clínica de *A. baumannii* RAB y ensayos de transposición mostraron su movilización (Bonin et al., 2012). El análisis de todos los ORFs no permitió distinguir ningún gen codificante de replicasa requerida para el inicio del proceso de replicación, en concordancia con lo que sugieren otros autores para los plásmidos con *bla_{NDM-1}* (Jones et al., 2015). Además, el sitio de inicio de replicación u *oriV* tampoco pudo ser determinado, según el empleo de Tandem Repeat Finder (ítem II.7.3, Mats. y Méts.). No obstante, Jones y cols., hipotetizaron que TraA podría actuar no solo como relaxasa sino también como replicasa (Jones et al., 2015) como se demostró para el plásmido RSF1010 (Frey et al., 1992). Este resultado sugiere que pNDM229 estaría utilizando la maquinaria de replicación del hospedador o posiblemente la replicasa de otro plásmido presente en la cepa.

El análisis efectuado del plásmido revela que pNDM229 contiene 3 genes de resistencia *bla_{NDM-1}*, *ble* y *aphA6*, de los cuales los primeros dos se encuentran como un operón dentro del *TnI25*, mientras que el tercero se localiza corriente arriba del mismo. Sin embargo, la identificación de un transposón compuesto flanqueado por dos *ISAbal4*, que incluye a *aphA6* y *TnI25*, constituiría una nueva plataforma de potencial movilización de dichos elementos genéticos. Además, pNDM229 contiene un SST4 incompleto, que lo hace no autotransferible, característica que sugiere una mayor posibilidad de fijación del plásmido en la cepa local, dado que sólo sería transferible ayudado por plásmidos “helpers”. Esto probablemente tiene una connotación positiva para su carácter de reservorio de genes de resistencia, teniendo presente el considerable costo de “fitness” de la bacteria por la portación de un plásmido con maquinaria conjugativa.

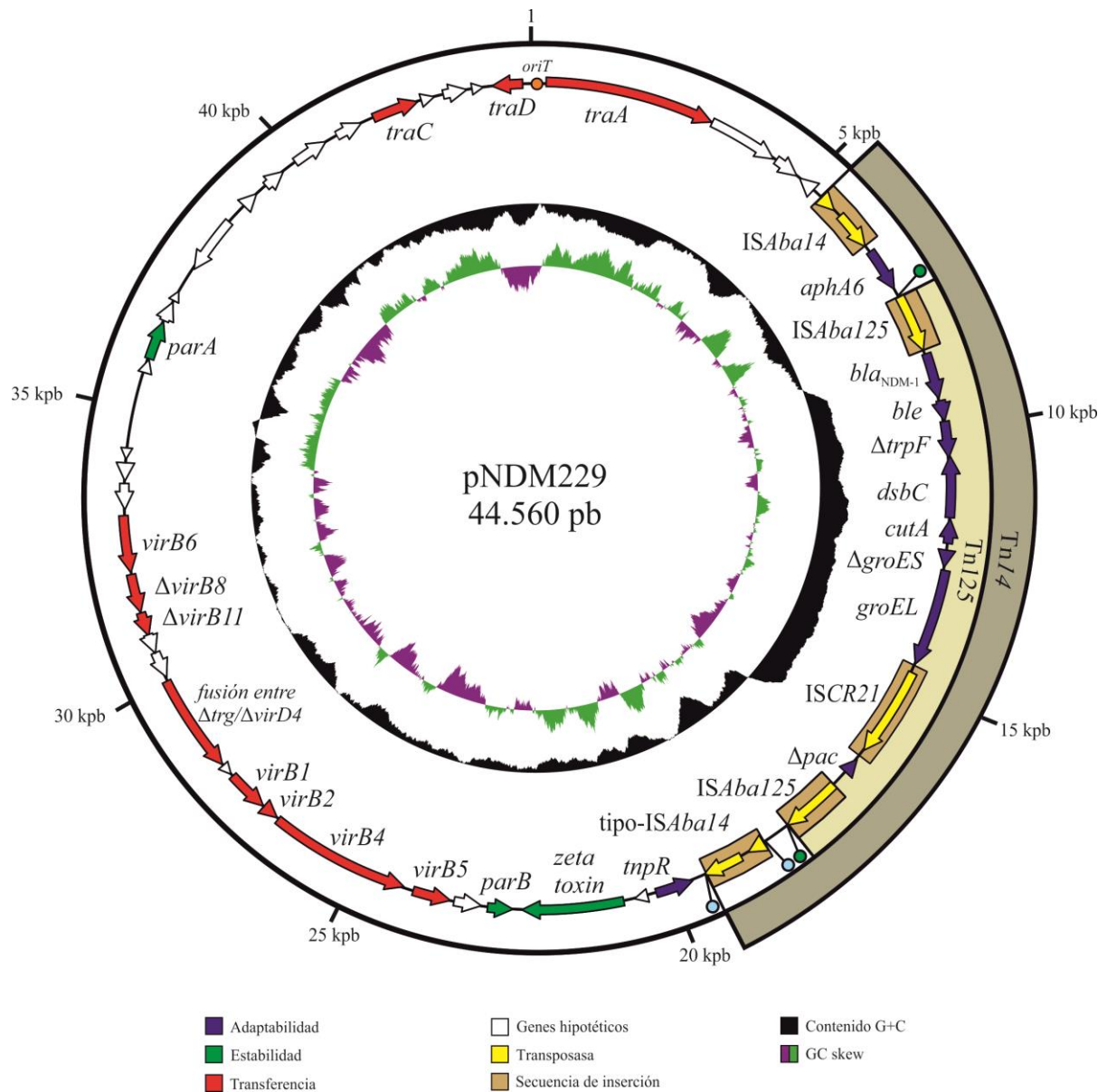


Figura III.2.4. Mapa circular de pNDM229. Los círculos desde afuera hacia adentro indican: i) tamaño en kpb, ii) secuencias codificantes (ver también Tabla A.2), iii) contenido GC, iv) “GC skew”. Tn125: en amarillo; Tn putativo flanqueado por ISAbal4: en verde grisáceo. DR (GTT) del Tn125: líneas con círculo verde en extremos; DR (AAAA) de ISAbal4: líneas con círculo celeste en extremos. Los genes están representados con flechas, y sus colores indican el módulo al cual pertenecen. Círculo naranja: sitio de inicio de la transferencia. El sentido de la transcripción de los genes, según la dirección de las flechas.

III.2.2.3.4.3. Análisis comparativo de plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1}

El desarrollo de amplias bases de datos de secuencias como la del NCBI (GenBank), así como la disponibilidad de herramientas bioinformáticas para el análisis de genomas, han facilitado el desarrollo de un área del conocimiento conocida como genómica comparativa (Wright et al., 2014). Así, análisis comparativos de secuencias disponibles permiten predecir EGM responsables de la diseminación de marcadores de resistencia (Wright et al., 2014), tanto como evaluar aspectos evolutivos de los mismos en su paso por diferentes hospederos. La masiva secuenciación de genomas de *Acinetobacter* spp. portadores de *bla*_{NDM-1} mostraron

que este determinante de resistencia se localiza tanto en cromosoma (Pfeifer et al., 2011; Poirel et al., 2011) como en plásmidos (Hu et al., 2012; Chen et al., 2012b; Sun et al., 2013; Zhang et al., 2013; Wang et al., 2014; Jones et al., 2015; Brovedan et al., 2015). Entre estos últimos, los plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1} reportados inicialmente en este género bacteriano fueron pNDM-BJ01 aislado de *A. lwoffii* WJ10621, y pNDM-BJ02 de *A. lwoffii* WJ10659 (ítem III.2.1.1; Tabla III.2.2; Hu et al., 2012). Luego, se depositaron otros 7 plásmidos similares en estructura por lo que se los denominó en conjunto como tipo-pNDM-BJ01 (ítem III.2.1.1; Tabla III.2.2). En este contexto, bajo el objetivo de evaluar comparativamente el plásmido de la cepa local con los reportados al presente, se determinó la similitud estructural de pNDM229 respecto a restantes plásmidos tipo-pNDM-BJ01 prevalentes en este género. Este análisis permite así abordar la evolución de las plataformas asociadas al Tn125 portador de *bla*_{NDM-1} en el género *Acinetobacter*. Para ello se efectuarán inicialmente análisis comparativos de la secuencia nucleotídica de pNDM229 contra pNDM-BJ01 derivado de *A. lwoffii*, de 47 kpb, y contra pNDM-40-1 derivado de *A. bereziniae* CHI-40-1, de 45 kpb. Se incluyen dichas secuencias en el análisis comparativo preliminar dado que pNDM-BJ01 es el prototipo de los plásmidos tipo-pNDM-BJ01; y que pNDM-40-1 es el único plásmido con *bla*_{NDM-1} caracterizado de una cepa clínica de *A. bereziniae*, lo que sugería inicialmente eventos de TH intra-especie de dichos plásmidos de resistencia. Análisis comparativos subsiguientes contra la base de datos completa disponible de plásmidos portadores del gen de interés de *Acinetobacter* spp. permitirán evaluar aspectos evolutivos de las plataformas en este género bacteriano.

Análisis comparativos de la secuencia nucleotídica completa de pNDM229 contra pNDM-BJ01 mostraron 99% tanto de identidad como de cobertura (Fig. III.2.5). Los genes asociados con funciones de estabilidad de pNDM-BJ01, *parA* y *zeta toxin*, muestran 99% de identidad nucleotídica con aquellos identificados en pNDM229 (Fig. III.2.5; ítem III.2.2.3.4.2). Por su parte, los genes del SST4 incluyendo *virB1*, *virB2*, *virB4*, *virB5*, *virB6*, *traC*, *traD* y *traA*, como así también el sitio *oriT* correspondientes al módulo de conjugación exhibieron 99% de identidad nucleotídica entre ambos plásmidos (Fig. III.2.5; ítem III.2.2.3.4.2). Estos resultados señalan que el esqueleto de pNDM-BJ01 y pNDM229 presentan homología. Asimismo, ambos exhiben la carencia de una replicasa reconocida, implicada en el inicio de la replicación plasmídica. Sin embargo, pNDM229 presenta diferencias respecto a pNDM-BJ01 en lo que concierne al módulo de transferencia, como la carencia total de genes correspondientes al SST4, incluyendo *virB9* y *virB10*, y parcial de *virD4*, *trg*, *virB8* y *virB11*, (Fig. III.2.5; ítem III.2.2.3.4.2). Específicamente en lo que concierne al módulo de adaptabilidad, pNDM229 presentó como diferencia esencial la presencia de una segunda copia de la secuencia de inserción tipo-IS*Aba14* corriente abajo del

Tn125 (Fig. III.2.5; ítem III.2.2.3.4.2). El conjunto de estas observaciones muestra que la cepa local contiene un plásmido tipo-pNDM-BJ01 con características únicas, que resultaría no conjugativo por la carencia de genes esenciales para la función de transferencia (*e.g.* *virB8-11*, *virD4*; Guglielmini et al., 2012), aunque potencialmente movilizable dado la presencia del gen codificante de la relaxasa (*traA*) y el sitio *oriT*. Asimismo, la región de adaptabilidad muestra la presencia de un transposón compuesto único, denominado aquí como “Tn14”, que permitiría la movilización no solo del Tn125 sino también de *aphA6* ubicado corriente abajo de la copia de IS*Aba14*, localizada corriente arriba del Tn125 (ítem III.2.2.3.4.2; Brovedan et al., 2015).

Análisis comparativos de pNDM229 y pNDM-40-1 de *A. bereziniae* exhibieron 99% de identidad y 96% de cobertura (Fig. III.2.5). La región de transferencia mostró las mismas diferencias descritas respecto a pNDM-BJ01, que incluye la carencia total de los genes *virB9* y *virB10*, y parcial de *virD4*, *trg*, *virB8* y *virB11* (Fig. III.2.5; ítem III.2.2.3.4.2). La región de adaptabilidad de pNDM229 también muestra diferencias, que incluyen no sólo la presencia de la segunda copia del elemento tipo-IS*Aba14* en pNDM229 (Fig. III.2.5) sino la delección parcial de los genes *ble* e IS*CR21*, y total del gen *trpF* en pNDM-40-1 (Fig. III.2.5). Por tanto, las diferencias se encuentran, al igual que con pNDM-BJ01, en la región de conjugación así como en la de adaptabilidad. Así, ambos clones de *A. bereziniae* difieren en sus marcadores moleculares (ítem III.2.2.2), por lo que este análisis muestra que plásmidos tipo-pNDM-BJ01 estarían potencialmente circulando en la población de *A. bereziniae*. Estos resultados permiten postular que pNDM229 pertenece al grupo de los plásmidos tipo-pNDM-BJ01 dado a que comparten la mayor parte del esqueleto, tal como fue sugerido para otros plásmidos tipo-pNDM-BJ01 hallados en *Acinetobacter* spp. (Tabla III.2.2; Jones et al., 2015).

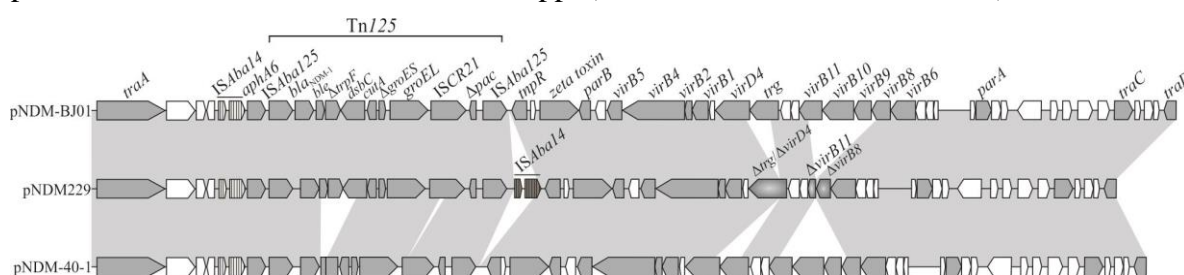


Figura III.2.5. Representación esquemática de plásmidos tipo-pNDM-BJ01 portadores de bla_{NDM-1}. Los mapas genéticos lineales de pNDM229, pNDM-BJ01 (NC_019268.1, arriba) y pNDM-40-1 (KF702385, abajo) fueron comparados, indicando una identidad superior al 99,0% (regiones sombreadas en gris). Genes codificantes de proteínas descritas: rectángulos con punta de flecha, grises. Genes codificantes de proteínas hipotéticas: rectángulos con punta de flecha, blancos. IS*Aba14*: rectángulos con punta de flecha, blancos con líneas verticales grises. Segunda copia de IS*Aba14* (presente solo en pNDM229): rectángulo con punta de flecha, gris con líneas verticales negras, cuya secuencia exhibe 94,0% de identidad con IS*Aba14* ubicada corriente arriba de Tn125. Delecciones parciales de *virD4*, *virB8*, *virB11* y *trg* (presentes solo en pNDM229): rectángulos con punta de flecha, gris en gradiente. El sentido de la transcripción de los genes, según la dirección de las flechas.

Estudios comparativos de la secuencia nucleotídica de pNDM-BJ01 contra base de datos de *Acinetobacter* spp. del NCBI revelaron que existen numerosos plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1}. Entre ellos, se incluyen 21 plásmidos con identidad y cobertura ≥ 84 , y solo 5 que presentan identidad de 99% y cobertura inferior al 25%, por lo que corresponderían a plásmidos no tipo-pNDM-BJ01 (Tabla III.2.2). Estos 21 plásmidos incluyen 9 reportados como correspondientes a los tipo-pNDM-BJ01 (Jones et al., 2015), pNDM-BJ01 y pNDM-BJ02, pNDM-40-1, pNDM-AB, pXM1, pAB_499, pAbNDM-1, pNDM-Iz4b, pM131_NDM-1 de *Acinetobacter* spp. (parte superior, Tabla III.2.2), como así también 12 plásmidos adicionales detectados en este trabajo, que incluyen a pNDM-JVAP01 de *A. dijkshoorniae* JVAP01 (Espinal et al., 2015), p6411 de *A. nosocomialis* 6411, pNDM1_010034 de *Acinetobacter* sp. WCHAc010034, p6200 de *A. baumannii* 6200, pNDM-0285 de *A. baumannii* ABNIH28, pNDM-AP de *A. pittii*, unnamed2 de *A. baumannii* AR_0088, pNDM1_010052 de *Acinetobacter* sp. WCHAc010052, pNDM1_010005 de *Acinetobacter* sp. WCHAc010005, y pNDM-9c17 de *Acinetobacter* sp. ACNIH1, pNDM-JN02 de *Acinetobacter* sp. JN247 (Zou et al., 2015), y por último el plásmido que posee *bla*_{NDM-14} pNDM-JN01 de la cepa *A. lwoffii* JN49-1 (Zou et al., 2015) (parte intermedia, Tabla III.2.2). El profuso análisis del conjunto de plásmidos de la parte superior e intermedia de la tabla (n: 22, incluyendo a pNDM229), reveló que los genes *parA* y *zeta toxin*, de la región de estabilidad; y los genes pertenecientes al SST4 (excepto algunos de ellos que presentan deleciones, como en los casos de pNDM229 y pNDM-AB), de la región de transferencia, exhiben identidades $>98\%$ con los correspondientes homólogos de pNDM-BJ01, por lo cual se los puede agrupar como plásmidos tipo-pNDM-BJ01 (Tabla III.2.2). Es de destacar que estos plásmidos replican en numerosas especies de *Acinetobacter* incluyendo *A. baumannii*, *A. bereziniae*, *A. calcoaceticus*, *A. dijkshoorniae*, *A. lwoffii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, y *Acinetobacter* sp. (Tabla III.2.2), lo que indicaría la diseminación de este EGM en el género. El conjunto de estos plásmidos poseen tamaños entre 39 y 49 kpb (Tabla III.2.2) siendo la extensión de las regiones de transferencia y estabilidad aproximadamente del 70% de la secuencia nucleotídica completa de los plásmidos, sugiriendo que las diferencias entre ellos radican esencialmente en la región de adaptabilidad. Debido a lo expuesto, se realizaron análisis comparativos de esta última región en particular, que comprende la estructura IS*Aba14-apha6*-Tn*I25*-tipo-IS*Aba14*-*tnpR* en el caso de la determinada previamente para pNDM229 (ítem III.2.2.3.4.2). Para este análisis se emplearon las secuencias nucleotídicas

correspondientes a los 21 plásmidos arriba mencionados, y la correspondiente al plásmido de la cepa local. Los resultados del empleo de herramientas bioinformáticas (BlastN, ítem II.7.3, Mats. y Méts.) revelaron que las regiones de adaptabilidad de algunos plásmidos son idénticas entre sí, como los casos de pAbNDM-1 y pNDM1_010034 que poseen una estructura de ~14 kpb en dicho módulo que comprende *ISAbal4-apha6-TnI25-ISAbal25-tnpR* (B, Fig. III.2.6); para los plásmidos pNDM-BJ01, pNDM-IZ4b, pXM1, pNDM-JVAP01, pNDM-01005, p6411, y p6200 se observa una estructura de ~13 kpb conteniendo *ISAbal4-apha6-TnI25-tnpR* (C); los plásmidos pM131_NDM-1 y pAB_D499 exhiben una plataforma de ~13 kpb conformada por los elementos *ISAbal4-apha6-ΔTnI25-ISAbal11-tnpR* (D); pNDM-JN02, pNDM-JN01 y unnamed2, exhiben una estructura de ~7 kpb conteniendo *ISAbal4-apha6-TnI25-tipo-ISAbal4-tnpR* (H); pNDM_AP y pNDM1_0052, una plataforma de ~5,5 kpb con *ISAbal4-apha6-ΔTnI25-tnpR* (I); y por último pNDM-9c17 y pNDM-0285, una estructura de ~5 kpb con *ISAbal4-apha6-ΔTnI25-tnpR* (J). Por otra parte, este alineamiento reveló estructuras únicas para los plásmidos pNDM229 de ~14 kpb conformada por *ISAbal4-apha6-TnI25-tipo-ISAbal4-tnpR* (A); pNDM-BJ02 de ~12 kpb con *ISAbal4-apha6-ΔTnI25-tnpR* (E); pNDM-40-1 de ~12 kpb conteniendo *ISAbal4-apha6-ΔTnI25-tnpR* (F) y pNDM-AB de 9 ~kpb con *ISAbal4-apha6-ΔTnI25-mph(E)-msr(E)-tnpR* (G).

La búsqueda sistemática en dichas estructuras de las repeticiones directas (DR) que flanquean al *TnI25* (GTT, líneas con círculo verde en el extremo, Fig. III.2.6), permite evaluar eventos recientes de transposición de dicho elemento. Este análisis mostró que todos los plásmidos tipo-pNDM-BJ01 poseen las mismas DR corriente arriba de *ISAbal25*. Sin embargo, sólo algunos de ellos (A, B, C, y, F; Fig. III.2.6) contienen dicha repetición directa corriente abajo de la segunda copia de *ISAbal25*, indicando en estos plásmidos eventos de reciente adquisición del *TnI25* (Fig. III.2.6), mientras que en los restantes se asume que eventos genéticos posteriores modificaron esta región. La prevalencia de plásmidos pNDM-BJ01 (C) detectados al presente en diferentes especies de *Acinetobacter* podría indicar a esta estructura como basal entre los plásmidos enmarcados en A, B y C (con *TnI25* intacto). Por tanto, la adquisición de ISs constituiría un evento genético vinculado a la evolución de estas plataformas e incluye la adquisición de tipo-*ISAbal4* en pNDM229 (A), *ISAbal25* en pAbNDM-1 y pNDM1_010034 (B). Aun cuando en estos plásmidos se observó la adquisición de ISs, el hallazgo específico del elemento tipo-*ISAbal4* corriente arriba del *TnI25* en pNDM229 de la cepa local mostraría un potencial transposón compuesto flanqueado por

elementos tipo *ISAbal4*, que permitiría la movilización del *Tn125* así como de *aphA6* (Figs. III.2.4, III.2.5 y III.2.6). El análisis comparativo de plásmidos con la estructura basal modificada, muestra esencialmente deleciones en la parte central o extremo 3' del *Tn125* (Δ *Tn125*, D-J, Fig. III.2.6). Las organizaciones genéticas en estos 12 plásmidos (D-J) muestran diferentes eventos genéticos, incluyendo la inserción de *ISAbal1* en pAB_D499 y pM131_NDM-1 (D), bordeada por ambas DR (líneas con círculos color rojo en los extremos) que indican un evento de reciente adquisición. En este caso, la copia de *ISAbal25* del extremo 3' se halla deletada, y la posibilidad de que *ISAbal1* permita la movilización del Δ *Tn125* es aún materia de estudio. Otro evento de inserción en este grupo de plásmidos es observado en pNDM-AB (G), en el cual se insertan genes que confieren resistencia a macrólidos *msr(E)* y *mph(E)* (Zhang et al., 2013). Asimismo en este plásmido, se observa la deleción de una región del *Tn125* que incluye la copia *ISAbal25* del extremo 3', conformando así un transposón no funcional. En el caso específico de pNDM-40-1, aun cuando deleciones de algunos genes del *Tn125* son observadas, la presencia de las dos *ISAbal25* bordeando la estructura sugiere que el elemento sería funcionalmente móvil. Es interesante notar que todas las ISs se localizan corriente abajo del *Tn125*, aunque no específicamente en el mismo sitio, sugiriendo que los plásmidos tipo-pNDM-BJ01 poseen una región "target" para la inserción de dichos elementos. Finalmente, la observación del alelo *bla*_{NDM-14} en la región de adaptabilidad de pNDM-JN01 (H) de *A. lwoffii*, plásmido semejante a pNDM-JN02 (H) portador de *bla*_{NDM-1}, indica una mutación puntual en la posición 389 de *bla*_{NDM-1} (A→G; Zou et al., 2015), poniendo de manifiesto así un nuevo evento genético que agrega evidencias de variabilidad genética en estas estructuras. Esta variante alélica *bla*_{NDM-14} fue observada exclusivamente al presente en el género *Acinetobacter*, y no en restantes especies bacterianas (Wu et al., 2019). El conjunto de estas observaciones aportan evidencias que muestran a este género como reservorio de genes de resistencia, dado que numerosas especies de *Acinetobacter* no sólo exhiben plásmidos tipo-pNDM-BJ01 sino que algunas de ellas ensamblan diferentes estructuras de transposones potencialmente funcionales dentro de la región de adaptabilidad (A, B, D, Fig. III.2.6). Asimismo, pudo evidenciarse de este análisis la incorporación de genes de resistencia en dicha región (G, Fig. III.2.6), así como de mutaciones puntuales que seleccionaron una variante alélica (H, Fig. III.2.6) que mostró mayor afinidad hacia imipenem y meropenem respecto a NDM-1 (Wu et al., 2019).

Por último, la estructura bordeada por dos tipo-IS*Aba14*, denominada como “Tn*I4*” (Fig. III.2.4) hallada en la cepa local *A. bereziniae* HPC229 es un ejemplo de un putativo transposón funcional. El mismo podría movilizar no sólo al Tn*I25*, y por lo tanto a *bl*_{NDM-1}, sino también a *aphA6*; estructura con ventajas selectivas dado que incluiría dos genes que confieren resistencia a antibióticos, siempre que un evento putativo de inserción de una IS provea un promotor fuerte al gen *aphA6*. Reportes previos de transposición de ISs en *A. baumannii* mostraron la funcionalidad de las mismas en algunos casos. Ejemplos de ello lo constituyen trabajos previos de nuestro laboratorio para IS*Aba825* (Ravasi et al., 2011), así como otros reportes de transposición de IS*Aba1* (Mugnier et al., 2009) y más recientemente de IS*Aba125* (Bontron et al., 2016). La funcionalidad del “Tn*I4*” es aún materia de estudio.

Plásmidos portadores de *bl*_{NDM-1} que exhiben baja identidad con los anteriormente descritos, y de tamaños oscilantes entre 30 y 190 kpb incluyen a pNDM-GJ01 (parte inferior, Tabla III.2.2; Zou et al., 2017) con 100% de identidad nucleotídica con el segmento que incluye Tn*I25-tnpR* de la región de adaptabilidad de pNDM-BJ01 (K, Fig. III.2.6); pNDM-GJ02 (Zou et al., 2017), pNDM1_010045 y pNDM-AP_882 (parte inferior, Tabla III.2.2; L, Fig. III.2.6) con 99% de identidad con el Tn*I25*; y por último, pNDM-32 (parte inferior, Tabla III.2.2; M) con una delección del extremo 3' del Tn*I25* (Δ Tn*I25*). En este último plásmido, el gen de interés se localiza en el Δ Tn*I25*, pero se halla flanqueado por IS*I5* conformando así un transposón compuesto. La búsqueda sistemática de DR bordeando al Tn*I25* de estos últimos plásmidos mostraron que pNDM1_010045, pNDM-AP_882 y pNDM-GJ02 (L, Fig. III.2.6) exhiben distintas repeticiones directas (DR, líneas con círculos de distintos colores en los extremos para cada EG, Fig. III.2.6) revelando eventos de transposición independientes en cada uno de los plásmidos mencionados, así como blancos diferentes al observado en el caso del Tn*I25* de plásmidos tipo-pNDM-BJ01 (A-F). Estas observaciones sugieren la adquisición del Tn*I25* por transposición en diferentes sitios blanco, así como en diferentes plásmidos, aportan evidencias de su profusa diseminación en este género. Por otra parte, la identificación en pNDM-GJ01 (K) de la región común del extremo 3' que incluye *tnpR* y 160 pb de región intergénica corriente arriba, presente en plásmidos tipo-pNDM-BJ01 (A-J, Fig. III.2.6), sugiere que en pNDM-GJ01 la región de adaptabilidad fue adquirida probablemente por eventos de recombinación entre un plásmido tipo-pNDM-BJ01 y otro no relacionado. Estos resultados en conjunto revelan que la secuencia nucleotídica compartida entre pNDM-BJ01 con los cinco plásmidos mencionados (parte

inferior, Tabla III.2.2) es la región de adaptabilidad compuesta por la secuencia total o parcial del *TnI25*, y *tnpR* (solo en pNDM-GJ01).

La totalidad de estos resultados pone en evidencia que la movilización de *bla*_{NDM-1} asociada al *TnI25* es un evento genético prevalente intra-genómico de la diseminación de *bla*_{NDM-1}, evidenciada por la detección de diferentes plásmidos portadores de dicho transposón (K-M, Fig. III.2.6) así como diferentes sitios blanco (L). En adición, eventos de transferencia de plásmidos constituyen eventos inter-genómicos prevalentes, dada la profusa detección de plásmidos tipo-pNDM-BJ01 portadores de *TnI25* (A-C), o Δ *TnI25* (D-J) en diferentes especies bacterianas de *Acinetobacter* spp. (Tabla III.2.2). Otros plásmidos no tipo-pNDM-BJ01 portadores de *TnI25* (K, L), o Δ *TnI25* (M) han sido reportados en *Acinetobacter* spp. agregando evidencias de otras estructuras plasmídicas que diseminan al gen de resistencia entre las especies del género. En este contexto, hay que destacar que la frecuente detección de *bla*_{NDM-1} en cromosoma de *Acinetobacter* spp. (Poirel et al., 2012; Pfeiffer et al., 2011) sería consecuencia de diferentes eventos genéticos. Estos incluirían, transposición de *TnI25* a cromosoma, mediada probablemente por conjugación y transposición, o recombinación no homóloga, o co-integración (Bontron et al., 2016); o transducción (Thomas et al., 2016). La transferencia de plásmidos portadores de este gen de resistencia vehiculizada por vesículas de membrana externa ha sido además recientemente reportada, y constituye así otro mecanismo que explicaría la profusa diseminación de este gen (Chatterjee et al., 2017).

Por otro lado, la evaluación comparativa de las regiones de adaptabilidad de los plásmidos, bajo la finalidad de identificar regiones comunes, permiten evaluar el origen de estas estructuras así como regiones menos expuestas a deriva génica. Este análisis denotó inicialmente una estructura común corriente arriba del *TnI25*, conformada por una región que incluye los elementos *ISAbal4*, y *aphA6* (región de 2.203 nt) para todos los plásmidos. Las estructuras genéticas de los plásmidos tipo-pNDM-BJ01 presentan *TnI25* intacto en 10 de los plásmidos descriptos (A-C, Fig. III.2.6), mientras que en los restantes se observan deleciones del *TnI25* (D-J). Aun así, la totalidad de estas estructuras muestran en su organización genética la región *ISAbal4-aphA6-bla*_{NDM-1}- Δ *ble* intacta (4.437 nt, región gris claro transversal en el extremo 5', Fig. III.2.6). Por otro lado, la comparación de las secuencias, en su extremo 3' muestra enorme diversidad, a excepción de 808 nt de la secuencia flanqueante en el 3'. Esta última incluye la secuencia codificante de la resolvasa *TnpR* (648 nt), así como 160 nt en la región intergénica corriente arriba de *tnpR* (región gris claro transversal en el

extremo 3', Fig. III.2.6). Aun cuando la figura III.2.6. ha sido confeccionada teniendo en cuenta las estructuras genéticas en orden descendente según su tamaño molecular bajo un intento de simplificar la observación de su variabilidad, esquemas hipotéticos evolutivos podrían ser propuestos. La búsqueda sistemática de elementos genéticos ancestrales en el género *Acinetobacter* de plataformas que contienen al Tn125 condujo al hallazgo de un elemento formado por Δ ISAbal4-aphA6-ISAbal4 en cromosoma de la cepa clínica *A. parvus* CIP 102159 (B, Fig. III.2.7); estructura que ha contribuido a la diseminación del gen *aphA6* (Yoon et al., 2014). Una estructura genética antecesora que presenta completa la ISAbal4 corriente arriba de *aphA6* es en este contexto imaginable (A, Fig. III.2.7). En ambas organizaciones genéticas, el promotor de *aphA6* se hallaría intacto, según lo observado para la estructura reportada por Yoon y cols. (Yoon et al., 2014). Eventos genéticos probables que explicarían el origen del módulo de adaptabilidad de plásmidos tipo-pNDM-BJ01 incluirían la transposición de un hipotético Tn14 a un transposón de tipo-Tn3, que deja corriente arriba del Tn14 al gen codificante de la resolvasa (TnpR, C); una delección de la región promotora de *aphA6* (D); la pérdida de ISAbal4 corriente abajo de la estructura, conformando así la estructura recientemente depositada en *A. pittii* UKK-0552 (E); la transposición del Tn125 a un plásmido de *A. lwoffii* dando origen así al pNDM-BJ01 (F) detectado por Hu y cols. (Hu et. al, 2012); y por último la adquisición de un elemento tipo-ISAbal4, que da lugar a la región de adaptabilidad del plásmido hallado en la cepa local *A. bereziniae* HPC229 (G). Estos eventos condujeron así a la formación de una estructura que exhibe la siguiente organización genética: en el extremo 5', una región (conservada) para plásmidos tipo-pNDM-BJ01 que incluye ISAbal4 y *aphA6* con una delección en su región promotora (visualizado como barra gris oscura izquierda, debajo de las plataformas, Fig. III.2.7); y en el extremo 3' una región (conservada) que incluye el gen *tnpR* y un fragmento de 160 pb corriente arriba de dicho gen (barra gris oscura derecha, debajo de las plataformas, Fig. III.2.7). Evidencias de este esquema evolutivo son provistas por la homología (identidad superior a 99%) observada para la región que abarca 53 nt de Δ ISAbal4; desde el nt 164 corriente arriba de *aphA6* hasta el nt 1.083, que constituye el sitio de inserción del Tn125; desde el nt 1.083 hasta el nt 1.557; y la región que va desde el nt 1.557-1.657, presentes en *A. parvus* CIP 102159 (Fig. III.2.8) así como en plásmidos tipo-pNDM-BJ01 (A-J, Fig. III.2.6). Eventos posteriores de delecciones (e.g. plásmidos tipo-pNDM-BJ01 con Δ Tn125, Fig. III.2.6), e inserciones (e.g. ISAbal4 en pNDM229, G, Fig. III.2.7) explicarían la emergencia de las diferentes estructuras ligadas a

movilización de *bla*_{NDM-1} en asociación a estos plásmidos. El esquema propuesto en este trabajo (Fig. III.2.7) aporta así dos estructuras genéticas ancestrales, reportadas para *A. parvus* y *A. pittii*, probablemente involucradas en el origen de los plásmidos tipo-pNDM-BJ01. Estos hallazgos agregan evidencia acerca del rol de especies ambientales de *Acinetobacter* (Wu et al., 2019), como reservorio de plataformas con *bla*_{NDM-1} y resalta el rol de estas especies no sólo en el origen del armado del gen quimérico *bla*_{NDM-1} (Toleman et al., 2012), en el origen del ensamble del Tn125 (Poirel et al., 2012), sino también en el origen del ensamble de los plásmidos tipo-pNDMBJ01.

Tabla III.2.2. Plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1} aislados de *Acinetobacter* spp.

Plásmido ^a	Tamaño (kpb)	Microorganismo	Número de acceso	Origen	País de origen	Referencia
pNDM-BJ01	47	<i>A.lwoffii</i> WJ10621	JQ001791	<i>Homo sapiens</i>	China	Hu et al., 2012
pNDM-BJ02	46	<i>A.lwoffii</i> WJ10659	JQ060896	<i>Homo sapiens</i>	China	
pNDM-40-1	45	<i>A. bereziniae</i> CHI-40-1	KF702385	<i>Homo sapiens</i>	India	Jones et al., 2015
pXM1	47	<i>A. calcoaceticus</i> XM1570	AMXH01000087	<i>Homo sapiens</i>	China	Sun et al., 2013
pNDM-AB	47	<i>A. baumannii</i> GF216	KC503911	Porcino	China	Zhang et al., 2013
pAB_D499	47	<i>A. pittii</i> D499	AGFH01000030	<i>Homo sapiens</i>	China	Chen et al., 2012
pAbNDM-1	48	<i>A. baumannii</i> ZW85-1	JN377410	<i>Homo sapiens</i>	China	Wang et al., 2014
pM131_NDM-1	48	<i>Acinetobacter</i> sp. M131	JX072963	-	-	-
pNDM-Iz4b	46	<i>A. lwoffii</i> Iz4b	KJ547696	<i>Homo sapiens</i>	-	-
pNDM229	44	<i>A. bereziniae</i> HPC229	KT072713.1	<i>Homo sapiens</i>	Argentina	Brovedan et al., 2015
pNDM-JVAP01	47	<i>A. dijkshoorniae</i> JVAP01	KM923969.1	<i>Homo sapiens</i>	Turquía	Espinal et al., 2015
p6411	47	<i>A. nosocomialis</i> 6411	CP010370.2	<i>Homo sapiens</i>	Colombia	-
pNDM1_010034	49	<i>Acinetobacter</i> sp. WCHAc010034	CP032278.1	Aguas residuales	China	-
p6200	47	<i>A. baumannii</i> 6200	CP010399.1	<i>Homo sapiens</i>	Colombia	-
pNDM-0285	39	<i>A. baumannii</i> ABNIH28	CP026127.1	Aguas residuales	Estados Unidos	-
pNDM-AP	39	<i>A. pittii</i>	KJ003839.1	<i>Homo sapiens</i>	China	-
pNDM-JN02	41	<i>Acinetobacter</i> sp. JN247	KM210088.1	<i>Homo sapiens</i>	China	Zou et al., 2015
pNDM-JN01 ^b	41	<i>A.lwoffii</i> JN49-1	KM210086.1	<i>Homo sapiens</i>	China	
unnamed2	41	<i>A. baumannii</i> AR_0088	CP027532.1	-	-	-
pNDM1_010052	39	<i>Acinetobacter</i> sp. WCHAc010052	CP032142.1	Aguas residuales	China	-
pNDM1_010005	39	<i>Acinetobacter</i> sp. WCHAc010005	CP032132.1	Aguas residuales	China	-
pNDM-9c17	39	<i>Acinetobacter</i> sp. ACNIH1	CP026425.1	<i>Homo sapiens</i>	Estados Unidos	-
pNDM-GJ01	30	<i>A. townneri</i> G165	KT965092.1	<i>Homo sapiens</i>	China	Zou et al., 2017
pNDM-GJ02	62	<i>A. townneri</i> G295	KT965093.1	<i>Homo sapiens</i>	China	
pNDM-32	84	<i>A. baumannii</i> CHI-32	LN833432.1	<i>Homo sapiens</i>	India	-
pNDM-AP_882	146	<i>A. pittii</i> strain AP_882	CP014478	<i>Homo sapiens</i>	Malaysia	-
pNDM1_010045	190	<i>Acinetobacter</i> sp. WCHA45	CP028560.1	Aguas residuales	China	-

^aParte superior de la tabla: plásmidos tipo-pNDM-BJ01 (n: 9) definidos por Jones y cols. (Jones et al., 2015); parte intermedia de la tabla: plásmidos definidos en este trabajo mediante análisis bioinformático (n: 12), incluyendo a pNDM229 de la cepa local en negrita (n: 13); parte inferior de la tabla: plásmidos no pertenecientes a los tipo-pNDM-BJ01 (n: 5).

^bPlásmido portador de *bla*_{NDM-14}

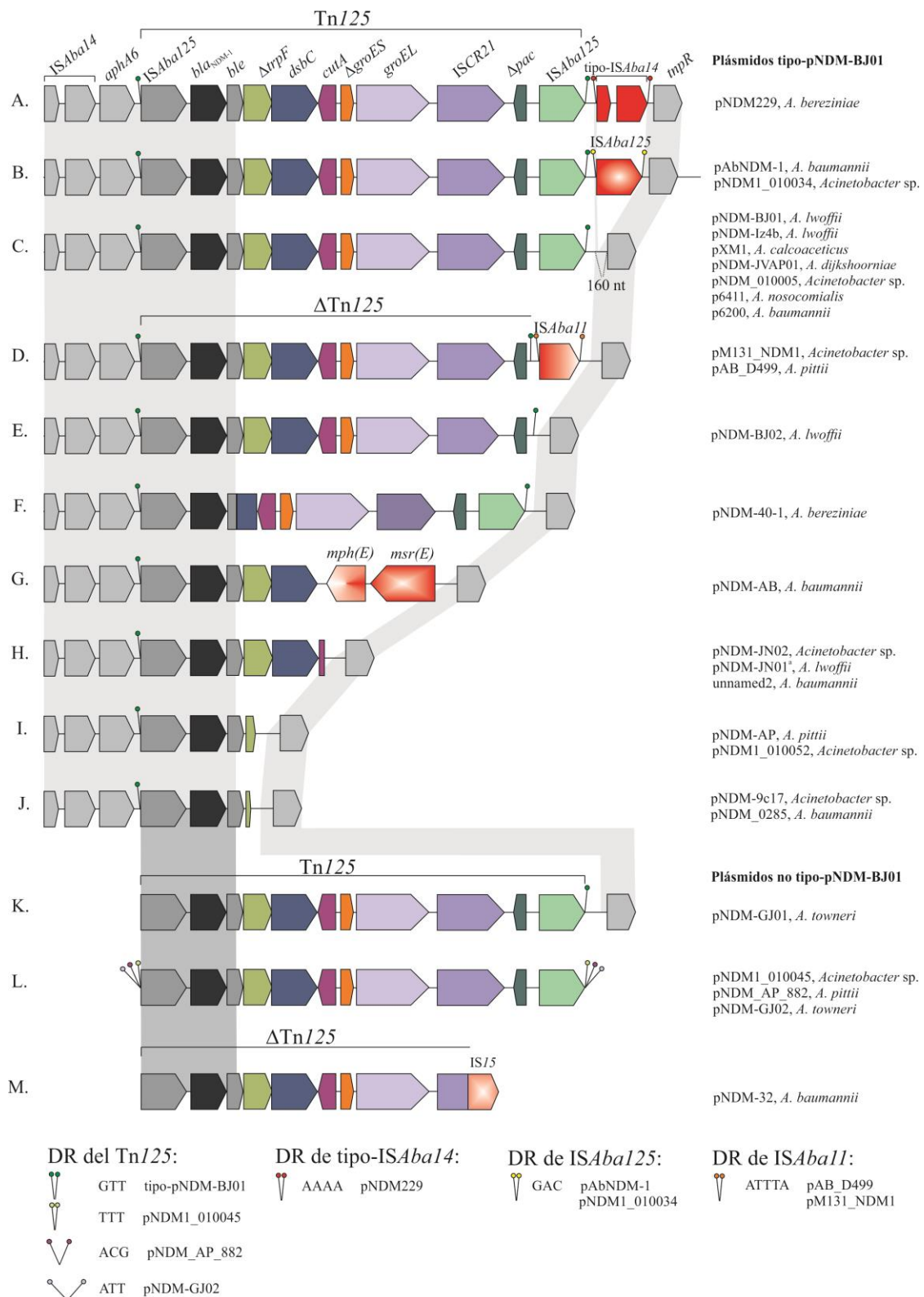


Figura III.2.6. Representación esquemática de plataformas portadoras de *bla*_{NDM-1} en plásmidos de *Acinetobacter* spp. El sentido de la transcripción de los genes, indicado según la dirección de las flechas. Rectángulos con puntas de flecha, en tonos de gris: genes presentes en todos los plásmidos; rectángulo con puntas de flecha, negro: *bla*_{NDM-1}; rectángulos con puntas de flecha, mismo color: genes compartidos entre plásmidos; rectángulos con puntas de flecha, gradientes de rojo: genes únicos. Regiones transversales sombreadas en gris claro, regiones compartidas por plásmidos tipo-pNDM-BJ01; regiones transversales sombreadas en gris oscuro, regiones compartidas por plásmidos tipo-pNDM-BJ01y no tipo-pNDM-BJ01. Líneas con círculos de colores en los extremos: repeticiones directas. Las regiones asociadas al Tn/25 o al ΔTn/25 se indican con líneas sobre las estructuras.

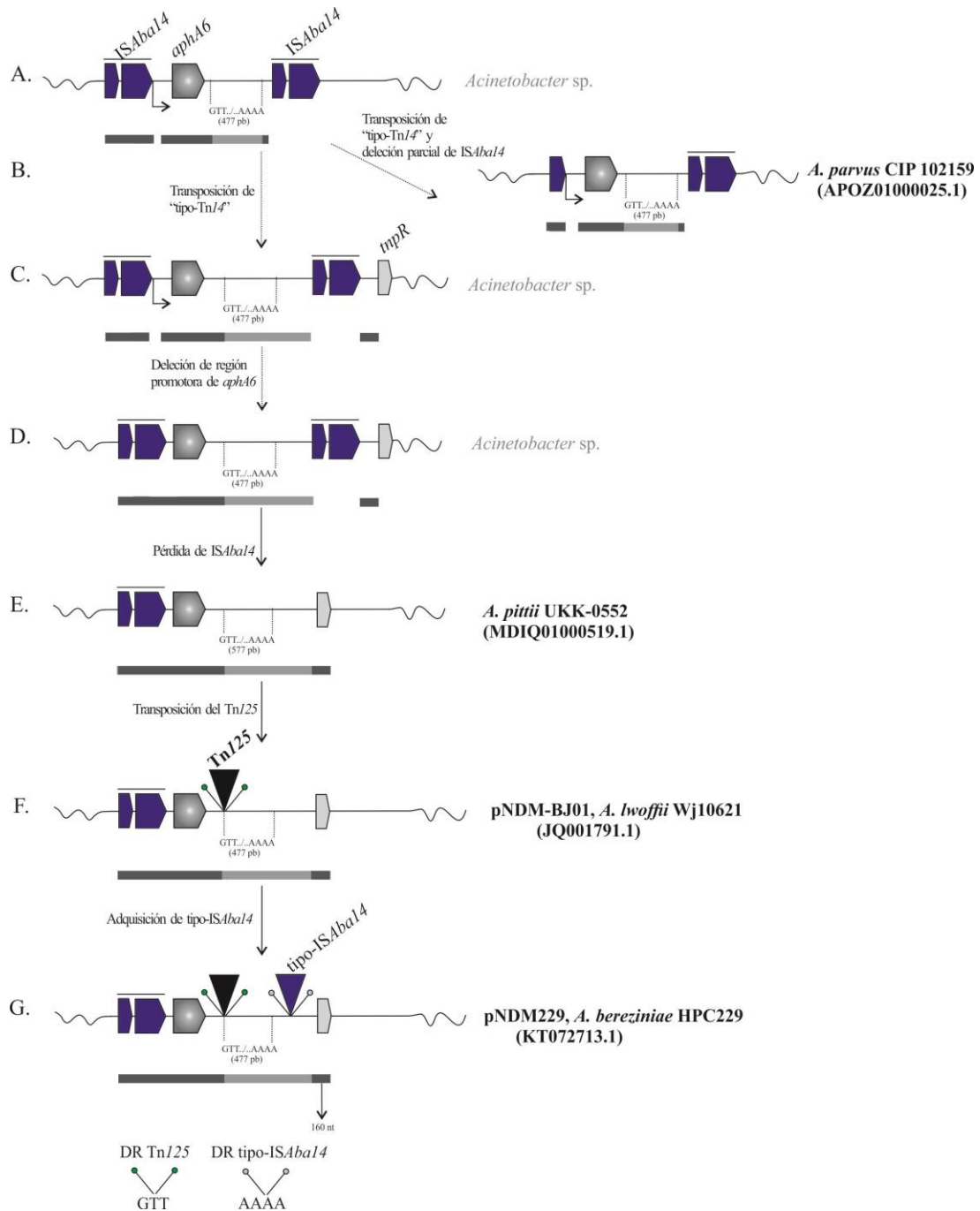


Figura III.2.7. Modelo hipotético del origen de la región de adaptabilidad portadora de *bla*_{NDM-1} en pNDM229 de *A. bereziniae* HPC229. A. Plataforma hipotética portadora de un transposón tipo-Tn14 en *Acinetobacter* sp. B. Plataforma detectada en *A. parvus* CIP 102159, Δ IS*Aba14*, deleción en IS*Aba14*. C. Estructura hipotética en *Acinetobacter* sp.; *tnpR*: gen codificante de resolvasa, corriente abajo del tipo-Tn14. D. Plataforma hipotética portadora en *Acinetobacter* sp.; ausencia de flecha corriente abajo de *aphA6*, pérdida del promotor. E. Estructura detectada en *A. pittii* UKK-0552 (MDIQ01000519.1). F. Plataforma detectada en el plásmido pNDM-BJ01 de *A. lwoffii* WJ10621; Tn125 flanqueado por las DR (GTT). G. Estructura detectada en pNDM229 de *A. bereziniae* HPC229; tipo-IS*Aba14* flanqueada por las DR (AAAA). A la izquierda de las flechas, eventos genéticos putativos. El sentido de la transcripción de los genes, según la dirección de las flechas. En rectángulos con puntas de flecha, azul: IS*Aba14*; rectángulos con puntas de flecha, gradiente de gris: *aphA6*; rectángulos con puntas de flecha, gris claro: *tnpR*; triángulo negro: Tn125, triángulo azul: tipo-IS*Aba14*. Líneas con círculos de colores en los extremos: repeticiones directas. Barras inferiores a las estructuras indican homología entre ellas. Barras gris oscuro: regiones conservadas en plásmidos tipo-pNDM-BJ01 (A-M; Fig. III.2.6, regiones transversales sombreadas en gris claro). Barras gris claro: regiones no conservadas en plásmidos tipo-pNDM-BJ01. En gris claro, especies hipotéticas.

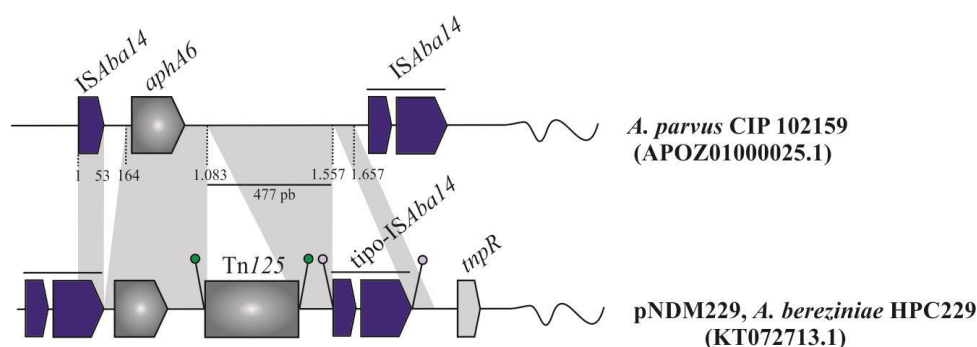


Figura III.2.8. Esquema comparativo de la estructura genética observada en *A. parvus* CIP 102159, y la región de adaptabilidad de pNDM229, derivado de *A. bereziniae* HPC229. Regiones transversales grises: regiones comunes de ambas estructuras. Para detalles, ver Fig. III.2.7.

Por último, la diseminación de *bla*_{NDM-1} en enterobacterias está ampliamente estudiada (Nordmann et al., 2012; Logan y Weinstein, 2017). Las especies productoras de NDM mayormente detectadas son *K. pneumoniae* y *E. coli*, seguidas en menor medida por *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Moraxella* spp., y *Citrobacter* spp. (Berrazeg et al., 2014; Wu et al., 2019). Entre ellas, se han reportado diversos clones epidémicos que incluyen a *K. pneumoniae* ST11 y ST147, y *E. coli* ST131 y ST101 (Logan y Weinstein, 2017). La identificación de *bla*_{NDM-1} en cromosoma de enterobacterias, e.g. en *E. coli* y *P. stuartii* (Poirel et al., 2011; Logan y Weinstein, 2017) justifica la diseminación esencialmente ligada a clones epidémicos. La mayoría de las variantes de NDM reportadas hasta el momento, NDM-1/NDM-3-13/NDM-15-24 han sido detectadas en enterobacterias (Wu et al., 2019); siendo NDM-2 y NDM-14 detectadas solo en *Acinetobacter* spp. (Liu et al., 2018; Wu et al., 2019). En este contexto de rápida y dramática diseminación de las distintas variantes de NDM desde su primer reporte en 2008 (Yoong et al., 2008), se hipotetizó que la profusa propagación se facilitó por su asociación a distintos EGM que incluyen al Tn125 (Poirel et al., 2011), Tn3000 (Campos et al., 2015), Tn3 (Villa et al., 2012), transposón compuesto flanqueado por IS26 (Ho et al., 2010), o por IS903 (Sekizuka et al., 2011). Resabios de ISAbal25 han sido observados sistemáticamente en estructuras detectadas recientemente, en las cuales *bla*_{NDM-1} se halla bordeada por otras ISs diferentes a la ISAbal25, e.g. ISKpn14 (Carattoli et al., 2012), y ISEc33 (Wu et al., 2019). Estas observaciones indicarían que originalmente ISAbal25 ha estado involucrado en la movilización de *bla*_{NDM-1} (Carattoli et al., 2011; Poirel et al., 2011). Varias de estas estructuras han sido localizadas en plásmidos, permitiendo así su extensa diseminación entre diferentes especies bacterianas. Los plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1} en enterobacterias muestran elevada diversidad respecto a tamaño (entre 30 a 300 kpb) y al menos 20 grupos de incompatibilidad, y aun otros no tipificables (Poirel et al., 2011; Wailan et al., 2015; Logan y Weinstein, 2017; Wu et al., 2019). Todas las plataformas detectadas hasta el momento en *Acinetobacter* spp. presentan la estructura ISAbal25-*bla*_{NDM-1}-*ble* (Fig. I.7; Nordmann et al., 2012) aunque en algunos casos ISAbal25 se encuentra interrumpida por

otros elementos (Carattoli et al., 2012; Ho et al., 2010; Villa et al., 2012). La presencia de *ISAbal25*, secuencia de inserción prevalente en *A. baumannii* (Adams et al., 2016), le provee a *bla_{NDM-1}* de un promotor fuerte para su expresión y por ello se mantiene en todas las plataformas detectadas al presente (Poirel et al., 2011). Debido a que *bla_{NDM-1}* se identificó como parte de un transposón compuesto (*Tn125*) flanqueado por *ISAbal25*, hipótesis actuales sostienen que dicho gen se originó como un gen quimérico probablemente en una especie ambiental desconocida (Bontron et al., 2016), seguido de su integración en cromosoma de *A. baumannii* (o *Acinetobacter* sp.) ambiental. Luego *bla_{NDM-1}*, capturado por una estructura móvil bordeada por *ISAbal25* (prevalentes en *Acinetobacter* spp.), da lugar al ensamble del *Tn125*. Esta estructura integrada en plásmidos de amplio rango de hospedador es movilizadora a enterobacterias y *Pseudomonas* (Nordmann et al., 2012; Bontron et al., 2016). En este contexto, ha sido demostrado que plásmidos tipo-pNDM-BJ01, portadores de *Tn125*, son replicativos en *E. coli* a partir de la recuperación de transconjugantes en ensayos de conjugación (Hu et al., 2012; Zhang et al., 2013; Jones et al., 2015). Recientemente, han sido reportados plásmidos tipo-pNDM-BJ01 de enterobacterias, e.g. p3SP-NDM de 46 kpb aislado de *Enterobacter aerogenes* p3SP (KP900015.1; Chen et al., 2015) y p06-1619-NDM de 54 kpb aislado de *Providencia rettgeri* 06-1619 (KX832928.1; Marquez-Ortiz et al., 2017). Estas evidencias sugieren que estos plásmidos se han transferido a enterobacterias, y la persistencia de los mismos ha posibilitado que otros EGM movilicen *bla_{NDM-1}* y su contexto genético inmediato, como los arriba mencionados transposones compuestos flanqueados por *IS903* (Sekizuka et al., 2011) e *IS26* (Ho et al., 2010) y el *Tn3000* (Campos et al., 2015); así como el pasaje posterior de estos elementos a diferentes plásmidos. Así, este escenario revela que la diseminación mundial de *bla_{NDM-1}* en enterobacterias tendría a los plásmidos tipo-pNDM-BJ01 como uno de los vehículos probables capaces de movilizar este gen de resistencia desde *Acinetobacter* hacia enterobacterias. Aun así, numerosos plásmidos portadores de EG con *bla_{NDM-1}* han sido detectados en numerosas especies de enterobacterias, mostrando así que la dispersión en este grupo bacteriano se debe a múltiples eventos intra-genómicos e intergenómicos. El hecho de que el *Tn125* portador de *bla_{NDM-1}* tenga su origen en *Acinetobacter* (Bontron et al., 2016) como también ha sido descrito para otros determinantes de resistencia como *aphA6* (Yoon et al., 2014), muestra la importancia de este grupo bacteriano en la formación de plataformas portadoras de genes de interés clínico, siendo a su vez capaces de diseminar dichos genes vehiculizados por diferentes plásmidos, algunos de amplio rango de hospedador, por lo cual ha sido posible el pasaje de *bla_{NDM-1}* a enterobacterias y *P. aeruginosa*.

Finalmente, los resultados presentados aquí revelan que la especie ambiental *A. bereziniae* es capaz de ensamblar potenciales estructuras funcionales como el “Tn14”, aportando así evidencias de la potencial diseminación de *bla*_{NDM-1} asociada a nuevas plataformas, y reafirman el rol de esta especie como reservorio de dicho gen.

III.2.2.4. Caracterización del contenido plasmídico de *Acinetobacter bereziniae* HPC229

Los plásmidos se encuentran entre los representantes más importantes en la evolución de los procariotas y en la adaptación a condiciones ambientales fluctuantes (Shintani et al., 2015). Los mismos suelen adquirir EG en su tránsito por distintos hospedadores bacterianos, tales como secuencias de inserción, transposones, integrones, que proveen ventajas selectivas (Partridge, 2018). Entre estas ventajas, se incluyen la adquisición de estructuras que contienen genes que confieren resistencia a antimicrobianos, o a metales pesados, entre otros. Así, los plásmidos constituyen elementos genéticos de captura y ensamble de plataformas de genes de resistencia, mediante eventos de transposición, y recombinación sitio-específica, constituyéndose luego en vehículos de diseminación de dichas estructuras mediante transferencia horizontal entre bacterias de especies filogenéticamente relacionadas como distantes (Bennett, 2008). En este contexto, el estudio del contenido plasmídico de la cepa HPC229 y análisis comparativos contra *Acinetobacter* spp, proveerán información útil sobre la variabilidad genética que proveen estos EGM a los genomas de una bacteria ambiental como *A. bereziniae*, asimismo capaz de sobrevivir en ambientes con alta presión antimicrobiana, *i.e.* asociada a colonización en pacientes hospitalizados. Finalmente, este conocimiento proveerá evidencias del intercambio de regiones génicas que aportan características adaptativas a miembros del género *Acinetobacter* spp., y aporta finalmente datos sobre el genoma accesorio de este relevante género constituido por especies ambientales y clínicas.

III.2.2.4.1. Identificación de plásmidos por métodos experimentales

La identificación del contenido plasmídico de HPC229 efectuada según los métodos de purificación descritos (ítem II.3.1, Mat. y Méts.) mostró la presencia de plásmidos con múltiples conformaciones y/o numerosos plásmidos (Fig. III.2.1, ítem III.2.2.3.3.1). Las dificultades en la identificación de las especies plasmídicas impulsaron a efectuar digestión enzimática con endonucleasa S1 para linealizar los plásmidos. Para ello, los extractos plasmídicos purificados según el método de lisis alcalina (ítem II.3.1, Mat. y Méts.) fueron sometidos a digestión con endonucleasa S1, y los digestos corridos electroforéticamente en geles de agarosa para visualizar los plásmidos en su conformación lineal (Fig. III.2.9). Se pudieron distinguir al menos 5 bandas discretas de tamaños aproximados de 20 kpb, 10 kpb, 6

kpb, 4 kpb, y 1,3 kpb, indicadas con puntas de flecha celeste (calle 2, Fig. III.2.9). Este resultado permite sugerir que HPC229 tiene al menos 5 plásmidos. Sin embargo, la visualización de plásmidos mediante esta metodología tiene sus limitaciones, y más aún si los plásmidos exhiben bajo número de copia (Barton et al., 1995). Otras técnicas permitirían estimar con mayor precisión el tamaño de plásmidos, incluyendo digestión con S1/PFGE y “Southern blot” (Jones et al., 2015). No obstante, en este trabajo se abordó la caracterización de los plásmidos *in silico*, basada en la identificación de los mismos empleando la secuencia de genoma completo de HPC229 (ítem II.6.2, Mats. y Méts.).

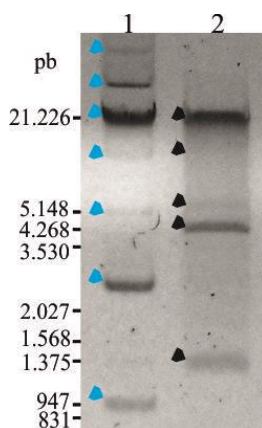


Figura III.2.9. Electroforesis en gels de agarosa de extractos plasmídicos digeridos con endonucleasa S1. Calle 1: extracto plasmídico obtenido por método de lisis alcalina; calle 2: digestos con S1 de los extractos plasmídicos. Puntas de flecha celeste: bandas obtenidas luego de purificación por lisis alcalina; puntas de flecha negra: bandas obtenidas luego de digestión con S1. A la izquierda, marcador de tamaño molecular (pb), ADN λ digerido con *EcoRI* y *HindIII*.

III.2.2.4.2. Análisis de secuencia y ensamblado de plásmidos de HPC229

La identificación de los replicones que presenta una bacteria puede inferirse a partir del análisis *in silico* de los datos obtenidos de la secuenciación completa de los genomas. La pirosecuenciación del contenido genómico de HPC229 (ítem II.6.2, Mats. y Méts.) seguido del análisis genético de los contigs mediante búsqueda de homologías permitió ensamblar uno de los plásmidos presente en la cepa, pNDM229 portador de *bla*_{NDM-1} (ítem III.2.2.3.4). El hallazgo de numerosas bandas, evidenciadas de los extractos plasmídicos digeridos con S1 (ítem III.2.2.2.1), permitió hipotetizar la presencia de diferentes plásmidos. Para confirmar esta hipótesis se utilizaron diversas herramientas bioinformáticas a fin de detectar contigs pertenecientes a posibles plásmidos (ítem II.7, Mats. y Méts.). En primer lugar, se realizó la búsqueda *in silico* de marcadores plasmídicos como replicasas y relaxasas empleando las herramientas bioinformáticas BlastX, RAST, y PlasmidFinder (ítems II.7.2 y II.7.3, Mats. y Méts.), de manera de identificar preliminarmente los contigs que contienen dichos marcadores. Este análisis permitió evidenciar inicialmente las secuencias nucleotídicas codificantes de 3 replicasas plasmídicas de la superfamilia Rep-3 (pfam01051) en contigs

distintos; así como 3 relaxasas involucradas en la movilidad de plásmidos (pfam03389 y pfam03432) en contigs diferentes. En dos de los contigs, se hallaron simultáneamente ambos marcadores. Numerosos genes que comúnmente pueden encontrarse en plásmidos como los correspondientes a sistemas Toxina-Antitoxina (TA), así como de partición (*parAB*) fueron asimismo detectados. El conjunto de estos datos permitió identificar 6 posibles contigs plasmídicos de aproximadamente 60, 50, 6, 4 y dos de 9 kpb, portadores de 1 o más de los marcadores arriba mencionados. Luego, los contigs identificados fueron empleados como “query” contra la base de datos del NCBI (GenBank) bajo la finalidad de seleccionar regiones homólogas presentes en plásmidos de *Acinetobacter* u otra especie bacteriana, que posibiliten identificar moldes para la unión de los contigs arriba mencionados, y/o búsqueda de nuevos contigs del genoma de la bacteria local. A partir de esta estrategia, se identificaron otros contigs de aproximadamente 2, y 0,5 kpb. Finalmente, se ensamblaron *in silico* los plásmidos mencionados, según la siguiente unión de contigs: para el plásmido de 114.007 pb, a partir de contigs de 60, 50, 2 y 0,5 kpb; para el plásmido de 15.389 pb de contigs de 9 y 6 kpb; y por último, los de 9.154 pb y 4.450 pb coinciden con los contigs arriba mencionados de 9 y 4 kpb, respectivamente (Fig. III.2.10). Por otra parte, la visualización de la banda de menor tamaño, observada de extractos plasmídicos digeridos con S1 y electroforesis (calle 2, Fig. III.2.9) impulsó la búsqueda de un contig que correspondiera con ese tamaño, encontrándose uno probable de 1.329 pb. Todas estas estructuras predichas a partir de análisis *in silico* impulsaron el diseño de cebadores específicos a fin de confirmarlas mediante PCRs y secuenciación (Fig. III.2.9; Tablas II.1 y II.2, Mats. y Méts.). Para el plásmido de 114 kpb se realizaron PCRs específicas empleando los pares 91D/37R, e independientemente 29D/91R; (Tabla II.1). En el caso del plásmido de 15 kpb se emplearon PCRs utilizando el par 76D1/80R1, y por otro lado 80D2/76R2 (Tablas II.1 y II.2, Mats. y Méts.). Para los plásmidos de 9.154, 4.450, y 1.329 pb se efectuaron PCRs con el par 75D/75R, 82D/82R, y 95D/95R (Tablas II.1 y II.2, Mats. y Méts.). El análisis de los amplicones secuenciados confirman las estructuras circulares de los 5 plásmidos identificados.

El análisis *in silico* del contenido plasmídico muestra que HPC229 alberga en total 6 plásmidos. Los resultados obtenidos permitieron interpretar las bandas visualizadas en la digestión con S1/electroforesis en gel de agarosa, y asignar a las bandas de ~ 10, 4 y 1,3 kpb (calle 2, Fig. III.2.9) coincidencia con el análisis bioinformático (9.154 pb, 4.450 pb y 1.329 pb; respectivamente). Los restantes plásmidos, de 114.007 y 15.389 pb, así como pNDM229 (ítem III.2.2.3.4) no pueden ser visualizados y podrían corresponder a replicones de bajo número de copia (ambos), al tamaño molecular (específicamente en el caso del primero), o bien podrían estar formando parte de especies plasmídicas cointegradas y por tanto de mayor

tamaño molecular, con la consecuencia de la dificultad en la observación para las condiciones experimentales efectuadas. La banda visualizada como de 6 kpb (calle 2, Fig. III.2.9) no pudo ser identificada por análisis *in silico*, y podría tratarse de un cointegrado entre plásmidos menores, de acuerdo a lo sugerido recientemente para especies plasmídicas en *A. baumannii* (Cameranesi et al., 2018). Finalmente se identificaron aquí 5 nuevos plásmidos denominados pAbe229-114, pAbe229-15, pAbe229-9, pAbe229-4, pAbe229-1 de acuerdo a sus tamaños moleculares.

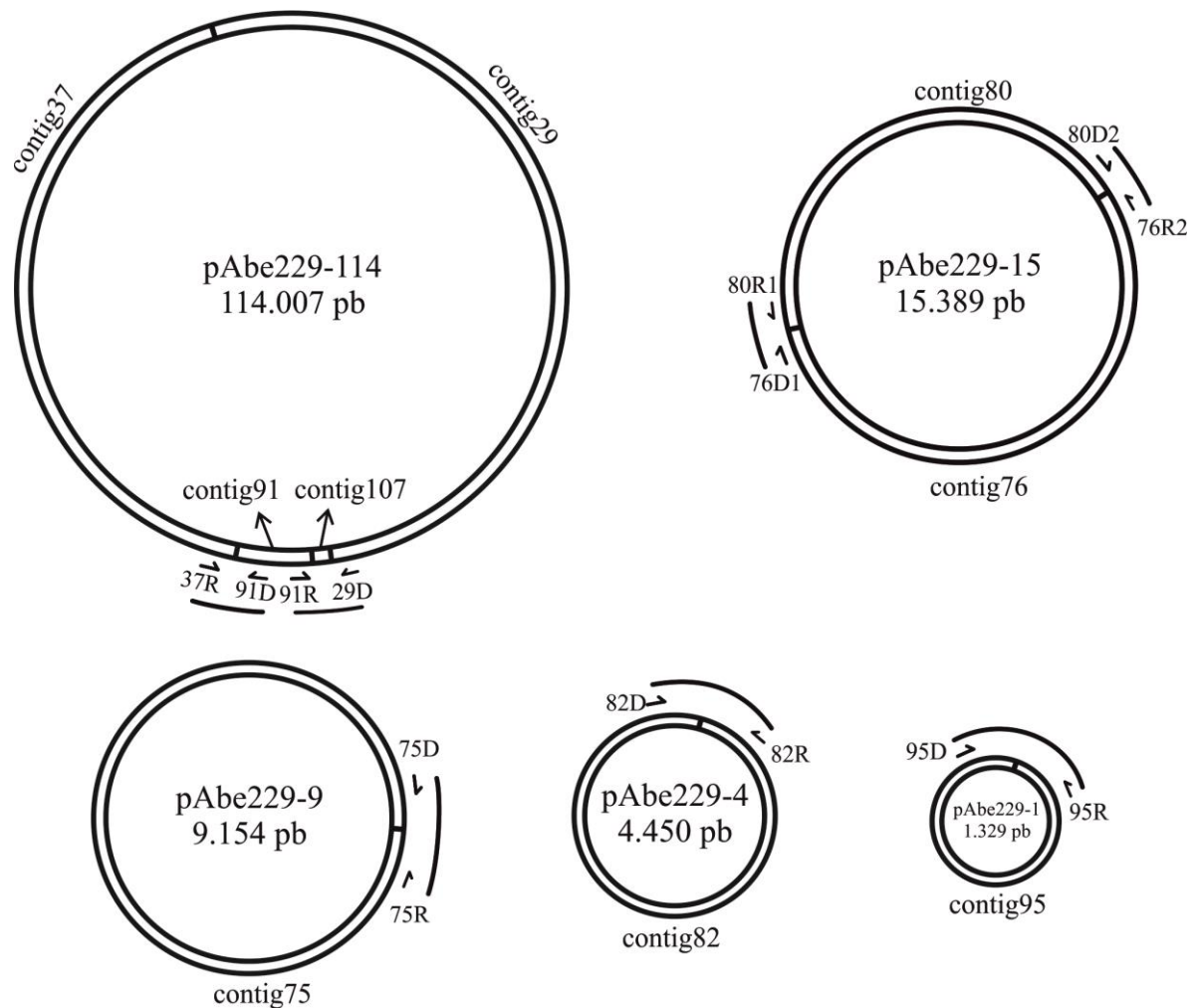


Figura III.2.10. Representación esquemática del ensamble *in silico* de pAbe229-114, pAbe229-15, pAbe229-19, pAbe229-4 y pAbe229-1. Las uniones predichas por los cebadores indicados fueron confirmadas por PCR. Las secuencias de los cebadores están mostradas en Tabla I.1 (ítem II.3.4.1, Mats. y Méts.).

III.2.2.4.3. Organización y caracterización de plásmidos presentes en HPC229

Los plásmidos tienen estructuras modulares, por lo cual funciones relacionadas se hallan agrupadas en segmentos específicos de las secuencias de los mismos (Norman et al., 2009). Los módulos puede derivar de orígenes filogenéticos diferentes, y los plásmidos resultarían de la unión de módulos funcionales adquiridos luego del pasaje por hospedadores

diferentes (Norman et al., 2009). Así, la secuenciación completa de estos elementos genéticos móviles podría aportar información valiosa del origen de los módulos, reflejando por tanto aspectos evolutivos del mismo (Norman et al., 2009). La identificación de las regiones de los plásmidos de HPC229 involucradas en replicación, estabilidad, transferencia y adaptabilidad, de acuerdo a esquemas sugeridos (Garcillán-Barcia et al., 2011) así como la comparación de las mismas con secuencias de plásmidos caracterizados, permitirán inferir la dinámica y evolución de los plásmidos de la cepa local, y tomar nociones de su adaptabilidad a diversos hospedadores. Para ello, se utilizan herramientas bioinformáticas que permiten revelar características distintivas de los plásmidos de la cepa local, y las mismas serán evaluadas comparativamente en el contexto de genomas y/o plásmidos depositados en base de datos.

Las características generales de los plásmidos fueron evaluadas mediante la herramienta bioinformática RAST de anotación automática de genomas (Aziz et al., 2008), y la búsqueda de genes homólogos se realizó por BlastP contra base de datos del NCBI (GenBank) expresando el homólogo de mayor porcentaje de identidad aminoacídica (Tablas A.3, A.4, A.5, A.6, A.7, Anexo). El plásmido de mayor tamaño detectado, pAbe229-114, posee 114.009 pb, y un contenido G+C de 42,1%. Se identificaron 111 marcos de lectura abiertos (orfs), de los cuales 84 codifican para proteínas de funciones atribuidas en bancos de datos (Fig. III.2.11) y el resto para proteínas hipotéticas (Tabla A.3 y Fig. III.2.11). Por otra parte, los plásmidos pAbe229-15 y pAbe229-9 que poseen tamaños de alrededor de 10 kpb agrupan como plásmidos pequeños de acuerdo a lo sugerido (Lean y Yeo, 2017). El primero presenta un contenido G+C de 35%, y 16 orfs, de los cuales sólo 9 codifican para proteínas de función atribuida en base de datos (Tabla A.4 y Fig. III.2.12.A). El segundo tiene un contenido de G+C de 35,4%, y su análisis nucleotídico permitió detectar 13 orfs, de los cuales 6 codifican para proteínas con funciones conocidas (Tabla A.5 y Fig. III.2.12.B). Por último, se caracterizaron los dos plásmidos de menor tamaño molecular y pertenecerían al grupo de plásmidos crípticos de acuerdo a propuestas de Lean y Yeo (Lean y Yeo, 2017). El primero de ellos, pAbe229-4 (4.450 pb de longitud) presenta un contenido G+C de 36,4%, y su análisis permitió detectar 7 orfs, de los cuales 3 codifican para proteínas con funciones conocidas (Tabla A.6 y Fig III.2.13.A). Por último, pAbe229-1 (G+C de 36,9%) muestra solo 2 marcos de lectura abierto sin homología con las secuencias en bases de datos de funciones conocidas (Tabla A.7 y Fig III.2.13.B). Las secuencias nucleotídicas de los plásmidos pAbe229-114, pAbe229-15, pAbe229-9, pAbe229-4 y pAbe229-1 fueron depositados en base de datos del NCBI (GenBank) siendo sus números de acceso CM012183.1, CM012184.1, CM012186.1, CM012185.1 y CM012182.1, respectivamente.

III.2.2.4.3.1. Caracterización de pAbe229-114

El análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica de pAbe229-114 permitió observar genes codificantes de proteínas con funciones compatibles con diferentes regiones, descritas como de replicación, estabilidad, transferencia y adaptabilidad (Garcillán-Barcia et al., 2011). Se identificó el gen codificante de una replicasa con dominio de la superfamilia Rep-3 (pfam01051) mediante análisis por RAST, BlastX (Altschul et al., 1990) y Pfam (Finn et al., 2016), (ítem II.7.2 y II.7.3, Mats. y Méts.). Su producto proteico, RepB, posee un 100% de identidad aminoacídica con la replicasa de *A. ursingii* UMB1319 y *A. nosocomialis* 2010S01-197 (WP_043972782.1; Tabla A.3). A partir de la detección de la replicasa se procedió a la búsqueda del posible origen de replicación (*oriV*) en el contexto inmediato de *repB*, de acuerdo a lo sugerido (Lean y Yeo, 2017). Una región compuesta por 6 secuencias repetitivas directas no idénticas o iterones (ítem I.4.2.1.1) fue identificada mediante la herramienta bioinformática Tandem Repeats Finder (Benson et al., 1990), (ítem II.7.3, Mats. y Méts.). Cada iterón está compuesto por 22 pb, siendo el consenso AAGTGAAGGCCTGTCACTAAT, ubicados 549 pb corriente arriba de *repA* (Fig. III.2.11). Así, la región de replicación hallada de 1.852 pb se compone de *repA-oriV*, estructura homóloga de acuerdo a lo reportado para plásmidos de *Acinetobacter* spp. que poseen replicasas con dominios de la superfamilia Rep-3 (Lean y Yeo, 2017). Se realizaron análisis comparativos de los iterones de pAbe229-114 contra una base de datos efectuada en el laboratorio (no mostrada) que incluye las secuencias iterónicas caracterizadas de numerosos plásmidos, mayoritariamente de *A. baumannii* (Bertini et al., 2010; Lean y Yeo, 2017). Los resultados mostraron que los iterones de pAbe229-114 presentan menos del 50% de identidad nucleotídica a partir de los análisis por BlastN contra la base de datos, revelando así iterones no caracterizados hasta el momento.

Por otra parte, numerosos genes correspondientes a los sistemas Toxina-Antitoxina (TA) tipo II (ítem I.4.2.1.1) fueron identificados mediante el uso de herramientas bioinformáticas como RASTA-Bacteria (Sevin y Barloy-Hubler, 2007), y TADB (Xie et al., 2018), y complementado este análisis mediante de la búsqueda de dominios con las herramientas BlastX y Pfam (ítem II.7.3, Mats. y Méts.). Así, cuatro sistemas completos que exhiben más de 99% de identidad aminoacídica con homólogos de distintas especies del género *Acinetobacter* fueron identificados. Entre ellos, los genes *hipA* (pfam13657 y pfam07804)/*hipB* (pfam01381); *fic* (pfam02661)/*yhfG* (pfam10832); *higA2* (pfam01381)/*higB2* (pfam06296); e *higA* (pfam13744)/*higB* (pfam05973) (Fig III.2.11; Tabla A.3; Chan et al., 2016). Además, se identificó el gen *hicB* codificante de la antitoxina del sistema TA HicAB aunque no se detectó el gen codificante de la toxina *hicA*. Es de destacar que estos sistemas no se encuentran contiguos, con excepción del par *hipA/hipB* y *fic/yhfG*, solo separados por un

marco de lectura (orf23) codificante de una proteína hipotética (Fig III.2.11; Tabla A.3). Por otro lado, genes *parA* (pfam13614) y *parB* (pfam00565), codificantes de proteínas vinculadas en la segregación plasmídica se identificaron a través de BlastX y Pfam. El conjunto de todos estos elementos conformarían la región de estabilidad (Fig III.2.11). La observación de algunos segmentos de esta región, separados en la secuencia del plásmido, revelaría la adquisición independiente de los mismos, mediada por diferentes eventos de THG.

Genes correspondientes al sistema de conjugación fueron detectados mediante RAST, BlastX y Pfam (ítem II.7.2, Mats. y Méts). El análisis de este segmento mostró la inclusión de los genes *traMLKJ-ΔtraI* correspondientes al SST4 (Fig III.2.11; Tabla A.3). El gen *traI* presenta el dominio relaxasa completo (pfam03432) aunque se encuentra interrumpido por IS*Aba22* en el extremo 3', a su vez truncada por IS*Aba12* (Fig III.2.11; Tabla A.3), y es por ello que se encuentra señalado como *ΔtraI*. La búsqueda de homología de este segmento por BlastN contra la base de datos del NCBI (GenBank) permitió detectar un segmento que exhibe 91% de identidad nucleotídica en el plásmido pQKH54 de una bacteria no cultivable, que presenta su módulo de conjugación completo (Haines et al., 2006). Asimismo, se pudo determinar el sitio *oriT* entre los genes *traK* y *traJ*, de 15 pb, según la comparación de ambos plásmidos. Este análisis mostró así los genes correspondientes a la región de transferencia de pAbe229-114.

Por último, marcos de lectura abiertos con dominios conservados vinculados con funciones relacionadas con la región de adaptabilidad se identificaron mediante herramientas bioinformáticas incluyendo RAST, BlastX, Pfam y TCDB (Saier et al., 2016). Entre las principales funciones detectadas, se destacan los genes implicados en la captación de iones metálicos, y en la resistencia a metales pesados, a estrés oxidativo y a fagos (Fig III.2.11; Tabla A.3). Los genes de transportadores de iones metálicos detectados fueron *feoAB*, cuyos productos proteicos FeoA (pfam04023) codificante de una proteína de unión a hierro, y FeoB (pfam07664) codificante de un transportador con ubicación en la membrana interna, están vinculados a la captación de hierro del medio extracelular a través de un sistema de transporte dependiente de ATP (Kammler y Hantke, 1993); así como *corA* (pfam01544) codificante de un transportador de magnesio/cobalto de la familia MIT (Lunin et al., 2006). Los genes involucrados en la resistencia a metales pesados detectados son *cusABCF* (COG3696, pfam16576, COG1538, pfam11604; respectivamente) que codifican para proteínas formadoras del sistema de eflujo tipo RND que confieren resistencia a cobre (Ou et al., 2015); *acr3* (COG0798) que codifica para una permeasa de la familia ACR3 perteneciente a la superfamilia BART que contribuye a la resistencia a arsénico; *nrpAB*, vinculados a la resistencia a níquel según ha sido mostrado en estudios realizados de la cepa de *Enterobacter* sp. NI15; *cadA* (COG1230) y su regulador *cadR* (TIGR02047) implicados en la resistencia a

cobalto/zinc/cadmio (Post y Hall, 2009); *fadAB*, genes vinculados con la resistencia intrínseca a aminoglucósidos (Gallagher et al., 2017); y el par tipo-*cadAR* que exhibe 65% de identidad respecto a los genes ya mencionados *cadAR*, inferido a partir del análisis comparativo entre ambos pares de genes. Además, se identificaron genes involucrados en la resistencia frente al estrés oxidativo, incluyendo *msrA* (pfam01625), *msrA2* (pfam01625), *msrA-like* (pfam01625), *selR* (pfam01641) y *selR-like* (pfam01641). La oxidación de metionina a metionina sulfóxido (MetO) de las proteínas dañadas por estrés oxidativo produce una mezcla de los isómeros R (R-MetO) y S (S-MetO) y por tanto las células requieren de enzimas estereo-específicas para la reducción de las metioninas oxidadas. La primer enzima descrita fue MsrA que reduce las proteínas que contengan S-MetO, mientras que recientemente se describió SelR que reduce específicamente las proteínas que contengan R-MetO. Asimismo, se detectaron otros genes que contribuyen a contrarrestar los efectos tóxicos debido a estrés oxidativo, incluyendo *grxC* (pfam00462) y *grxC-like* (pfam00462) codificantes para la glutarredoxina; y el gen *gstA* (pfam02798) codificante de la glutathione S-transferasa. Es importante aclarar que el alineamiento de las secuencias nucleotídicas entre las tres copias de *msrA* dio como resultado identidades menores al 50% mostrando así que podrían ser distintas isoformas de la proteína. El mismo análisis se realizó con las secuencias de *selR* (y *selR-like*) por un lado, y *grxC* (y *grxC-like*) por otro, obteniendo también identidades por debajo del 50%. Así, los resultados muestran que pAbe229-114 codifica para numerosos genes cuyos productos proteicos tienen los mismos dominios (*msrA*, *selR* y *grxC*). Por último, se detectaron los genes *pglX* (pfam08665), *pglY* (pfam13659), *brxA* (pfam08849), *brxB* (pfam08747), *brxC* (pfam10923), y *brxL* (COG4930) codificantes de una DNA metilasa, una proteína con dominio ATPasa, dos proteínas de función desconocida, una fosfatasa alcalina y una proteasa tipo Lon, respectivamente, involucradas en la inhibición de la replicación de algunos fagos. Estos genes integran el sistema BREX tipo I descrito recientemente en *Bacillus subtilis* (Goldfarb et al., 2015).

La caracterización de pAbe229-114 muestra que las regiones de replicación y transferencia arriba descritas componen módulos, según la descripción modular de los plásmidos (Garcillán-Barcia et al., 2011). Por el contrario, los genes de las regiones de estabilidad y adaptabilidad se encuentran distribuidos a lo largo de la secuencia del plásmido de manera no contigua, sugiriendo que determinados segmentos genéticos de estas regiones podrían haberse adquirido en eventos sucesivos de THG. Es interesante notar la presencia de un sistema de replicación autónomo y de numerosos sistemas TA en pAbe229-114, lo que permite inferir que este plásmido está dotado de variados mecanismos para persistir en este hospedador. En este contexto, el sistema de conjugación truncado añadiría otro elemento para la fijación del plásmido en la cepa. Por último, el análisis de la región de adaptabilidad

muestra que pAbe229-114 contiene un arsenal de genes que le permiten a HPC229 sobrevivir a ambientes hostiles.

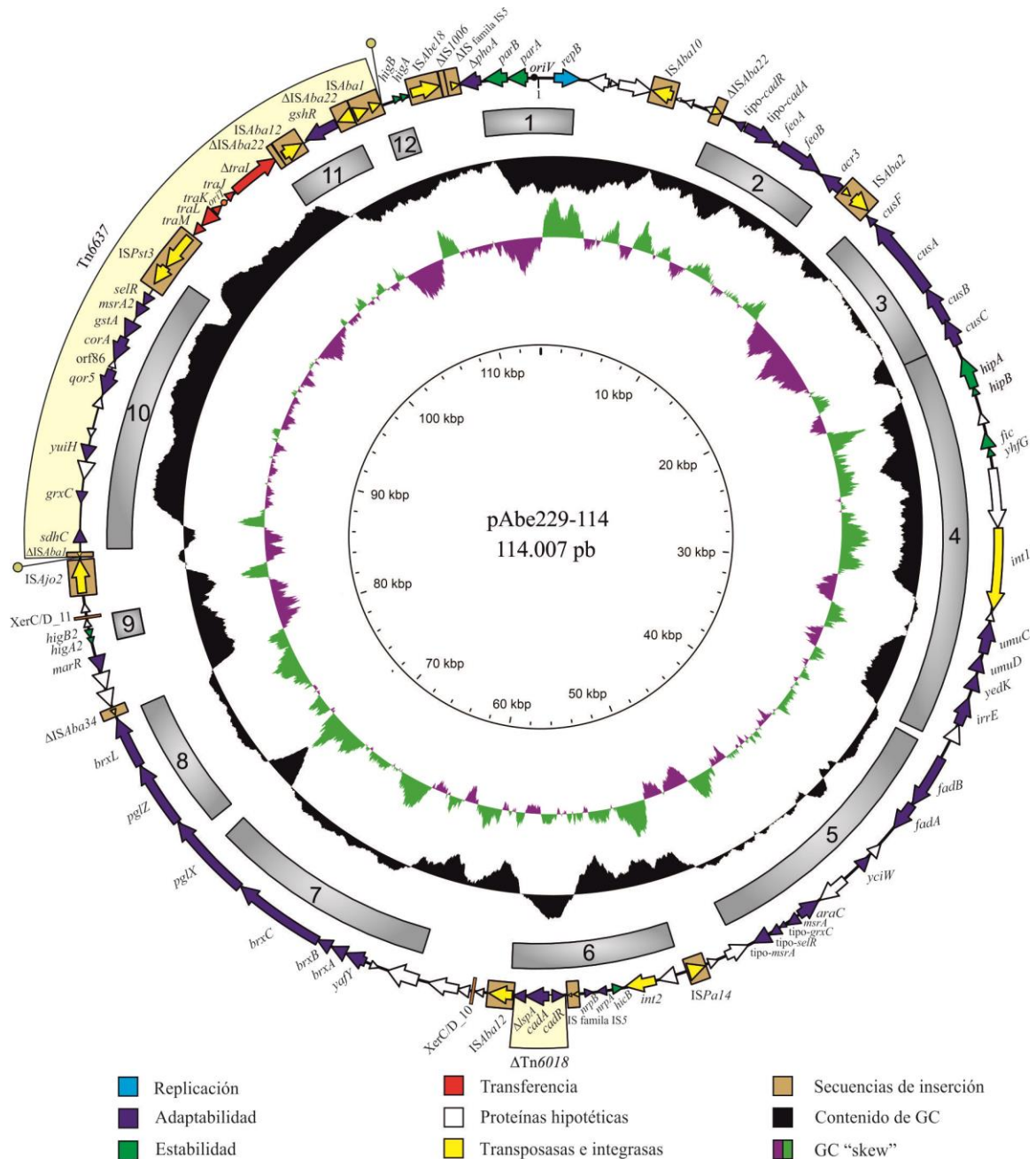


Figura III.2.11. Representación esquemática de pAbe229-114. Secuencias codificantes, en el sentido de la dirección de la transcripción. Genes incompletos o deletados: Δ precediendo a la denominación del gen. Círculo negro: región predicha de *oriV*; Tn6637 flanqueado por IS*AbaI* y Δ IS*AbaI*: en amarillo; DR flanqueando al Tn6637 (AATAAAGAT): líneas con círculos amarillo pálido. Sitios XerC/D: rectángulos naranjas. Los círculos (desde el externo al interno) señalan: i) secuencias codificantes predichas; ii) regiones homólogas descritas en plásmidos/cromosomas de cepas de *Acinetobacter* no-*bereziniae* (Tabla III.2.5); iii) contenido GC relativo al promedio del contenido promedio del plásmido, iv) GC “skew”, “skew” positivos: en verde; “skew” negativos: en violeta; y v) escala (en kpb).

III.2.2.4.3.1.1. Elementos genéticos móviles (o movilizables) presentes en pAbe229-114

La idea de que los plásmidos son estructuras mosaico compuestas por una estructura central de genes esenciales, o “backbone”, constituido por los módulos de replicación, estabilidad y transferencia, intercalados con segmentos de genes accesorios que forman parte de la región de adaptabilidad, provenientes del “mobiloma”, es actualmente el esquema más aceptado. El “mobiloma” incluye numerosas unidades genéticas que pueden transferirse mediante eventos intercelulares e intracelulares (Patridge et al., 2018). Entre los EG, se encuentran elementos transponibles como transposones (Tn) y secuencias de inserción (IS), así como EG movilizables incluyendo integrones e islas genómicas (Patridge et al., 2018). En este contexto, y bajo la hipótesis de dilucidar potenciales eventos de intercambio genético que otorgan ventajas selectivas para la persistencia del plásmido, la identificación de estos elementos resulta esencial.

La búsqueda de EGM de pAbe229-114 a través de las herramientas ISFinder (Siguier et al., 2006) y BlastX permitió la identificación de 15 secuencias de inserción diferentes, identificadas asimismo en *Acinetobacter* spp. o *Pseudomonas* spp. (Fig. III.2.11; Tabla III.2.4). Entre ellas, se detectaron tres copias incompletas de IS*Aba22* y dos copias completas de IS*Aba12*; ambas habitualmente presentes como copias múltiples en genomas de *A. baumannii* (Adams et al., 2016). Además se han detectado 2 copias de IS*Aba1*, una de ellas incompleta, así como copias únicas de IS*Aba2*, IS*Aba10* y Δ IS*Aba34* (Fig. III.2.11; Tabla III.2.4); todas detectadas mayoritariamente en genomas de *A. baumannii*. Fueron asimismo detectadas ISs (o productos de sus delecciones en algunos casos) reportadas en otros miembros del género *Acinetobacter*, como IS*Ajo2* (*A. johnsonii*), Δ IS1006 (*A. junii*), y dos IS tipo-IS5 (*A. lwoffii*) truncadas (denominada por ello Δ IS5, Tabla III.2.4) o con codones prematuros de terminación de la transcripción, por ello defectiva (Fig. III.2.11; Tabla III.2.4). Por otra parte, dos ISs homólogas a aquellas descritas en *Pseudomonas* spp. incluyendo IS*Pa14* (*P. aeruginosa*) e IS*Pst3* (*P. stutzeri*) (Fig. III.2.11; Tabla III.2.4) fueron detectadas. Por último, ha sido identificada una nueva IS, asignada en este trabajo como IS*Abe18*, según la base de datos ISSaga (Siguier et al., 2006). Es de destacar que solo IS*Abe18* e IS*Aba10* presentaron ambas repeticiones directas bordeando a sus respectivas repeticiones invertidas, sugiriendo en ambos casos su reciente adquisición (Tabla III.2.4). Por su parte, IS*Aba12*, Δ IS*Aba22*, IS*Abe18*, Δ IS1006 y Δ IS de la familia IS5 se encuentran interrumpiendo diferentes genes, como *ispA*, cuyo producto proteico cataliza la eliminación de péptidos señal en lipoproteínas (Tabla A.3); *traI*, codificante de relaxasa (Tabla A.3); *tnpA*, codificante de la transposasa de IS1006 (Tabla A.3); *tnpA*, codificante de la secuencia de inserción de la familia IS5 (Tabla

A.3); y *phoA*, codificante de una putativa fosfatasa alcalina (Tabla A.3); respectivamente (Fig. III.2.11; Tabla II.2.4). Estas observaciones revelan la importancia de las ISs en el modelado de la arquitectura de pAbe229-114. Notablemente, las ISs descritas (Fig. III.2.11; Tabla III.2.4) no se encuentran en cromosoma según análisis efectuados empleando la secuencia completa del genoma obtenido por pirosecuenciación (datos no mostrados), sugiriendo que estos elementos fueron adquiridos en diferentes eventos derivados de la movilización del plásmido por diferentes hospederos.

Una región de 18.283 pb flanqueada por Δ IS*Aba1* y Δ IS*Aba22* exhibe un contenido GC más alto que el promedio de la secuencia nucleotídica (~57% *versus* ~42%), según puede observarse del análisis del GCviewer (Fig. III.2.11). Debido al alto contenido GC, esta región sugiere su adquisición por THG desde un hospedador distinto a *Acinetobacter*. En línea con esta hipótesis, se identificó una secuencia con más de 85% de identidad nucleotídica en *P. stutzeri* B1SMN1 (AMVM0000000000.1), bacteria que exhibe un contenido GC similar a la región mencionada (57-64%). Además, se identificó una segunda copia de IS*Aba1* corriente arriba de Δ IS*Aba22*. Esta segunda copia de IS*Aba1* permitió hipotetizar que esta región que incluye genes de conjugación y numerosos genes de resistencia a estrés oxidativo conformarían un transposón. Este elemento completo, de 22.744 pb, fue asignado como Tn6637 (“Tn Number Registry”, Roberts et al., 2008). La presencia de repeticiones directas de 9 pb junto a ambas repeticiones invertidas externas de IS*Aba1* sugiere su reciente adquisición (Fig. III.2.11; Tabla III.2.4). Por otra parte, ha sido detectada en la secuencia nucleotídica del pAbe229-114 la estructura parcial del Tn6018. Este transposón ha sido caracterizado en *A. baumannii* en una isla genómica y se halla constituido por los genes *cadAR*, que confieren resistencia a cobalto/zinc/cadmio, *ispA*, cuyo producto proteico cataliza la eliminación de péptidos señal en lipoproteínas, y *tnpA* codificante de una transposasa que permite la movilidad del elemento a través del reconocimiento de la secuencias invertidas flanqueantes (Post y Hall, 2009). En pAbe229-114, el Tn6018 se encuentra incompleto, dada la ausencia de *tnpA* y la interrupción de *ispA* debido a la inserción de IS*Aba12* (Fig. III.2.11; Tabla III.2.4).

La búsqueda de marcadores de islas genómicas permitió identificar dos genes codificantes de integrasas, *int1* (pfam00589) de 3.200 pb y 34,7 % GC, localizada corriente abajo del sistema *fic/yhfG* (Fig. III.2.11), e *int2* (pfam00589) de 1.199 pb y 37,8% GC ubicada corriente arriba del gen *hicB* (Fig. III.2.11). Se determinó que ambas integrasas poseen dominios conservados pertenecientes a la superfamilia de las tirosín-recombinasas

según BlastP y Pfam. Entre los miembros de la superfamilia, ambas integrasas estarían incluidas en la familia de las recombinasas XerC y XerD (pfam00589), siendo esta una de las familias de integrasas asociadas frecuentemente a islas genómicas (Farrugia et al., 2015), y ambas proteínas estarían involucradas en adquisición y pérdida de islas genómicas mediante recombinación sitio-específica (Dominguez et al., 2011). La identificación de ambas integrasas asociadas a la misma familia impulsó el alineamiento entre ellas mediante ClustalW (ítem II.7.3, Mats. y Méts.). La identidad observada fue de 33% mostrando su pertenencia a grupos de integrasas distintas dentro de la misma familia. Estas observaciones permitieron hipotetizar que ambas integrasas podrían estar implicadas en la integración de islas genómicas. El análisis pormenorizado de sus entornos genéticos cercanos mostró genes comúnmente presentes en islas genómicas. Por un lado, la presencia de genes que codifican sistemas TA diferentes, así como las subunidades UmuC y UmuD de la ADN polimerasa V, corriente arriba y corriente abajo del gen *int1*, respectivamente; y por otro lado, la identificación de *hicB* (codificante de la antitoxina del sistema HicAB) y *nrpAB* (codificantes de proteínas que confieren resistencia a níquel) corriente abajo de *int2* (Fig. III.2.11). Estudios recientes han mostrado que los genes codificantes de los sistemas TA y los genes *umu* están vinculados a islas genómicas (Farrugia et al., 2015) reforzando la idea de que estas regiones podrían constituir islas adquiridas por THG. Así, llamamos isla genómica 1 (GI1) a la región que comprende desde *hipA* hasta el orf corriente arriba de *fadB* (Fig. III.2.11), e isla genómica 2 (GI2) que incluye los genes *hicB*, *nrpAB* y la IS defectiva de la familia IS5 (Fig. III.2.11). Sin embargo, no pudieron detectarse los sitios de inserción de las islas mediante programas bioinformáticos que predicen integración de islas o fagos como IslandView4 (Bertelli et al., 2017) o PHASTER (Arndt et al., 2016). Por último, estas islas genómicas putativas contienen genes de estabilidad y adaptabilidad relevantes para el mantenimiento del plásmido, y para la adaptación del hospedero a diferentes nichos ambientales.

El conjunto de estas observaciones revela la importancia de eventos de THG en la adquisición de elementos genéticos que aportan nuevas características, como la ganancia del elemento Tn6637, que confiere resistencia a estrés oxidativo, así como Tn6018 y GI2 que confieren resistencia a metales pesados; observaciones que evidencian potenciales eventos genéticos que explican la amplia capacidad de adaptación de las bacterias.

Tabla III.2.4. ISs y transposones detectados en pAbe229-114

Designación	Elemento genético ^a	Origen	Localización (inicio-final)	Hebra ADN	Longitud (nt)	DR	Presencia Coincidencia más cercana contra de IR ^b base de datos de ISSaga ^c			
							IRl	IRr	% identidad nucleotídica	Número de acceso
IS <i>Aba10</i>	IS	<i>A. baumannii</i>	4.321-5.343	-	1.023	ATCTAATAC	+	+	99	GQ379223
Δ IS <i>Aba22</i>	Δ IS		6.871-7.297	+	427	-	-	+	99	
Δ IS <i>Aba22</i>	Δ IS	<i>A. baumannii</i>	102.999-	+	155	-	+	-	99	CP001937
Δ IS <i>Aba22</i>	Δ IS		105.725-	-	709	-	-	+	100	
IS <i>Aba2</i>	IS	<i>A. baumannii</i>	12.856-14.213	+	1.358	-	+	+	91	AY665723
IS <i>Pa14</i>	IS	<i>P. aeruginosa</i>	50.326-51.113	-	788	-	+	+	94	KX426227.1
tipo-IS5 ^d	IS defectiva	<i>A. lwoffii</i>	55.257-56.018	+	762	-	+	+	99	KX528687.1
IS <i>Aba12</i>	IS	<i>A. baumannii</i>	58.075-59.113	+	1.039	-	+	+	96	ACYR01000092
IS <i>Aba12</i>			103.154-104.192	+	1.039	-	+	+	99	
tipo- Δ IS <i>Aba34</i>	Δ IS	<i>A. baumannii</i>	78.361-78.745	-	385	-	+	-	89	KU744946
IS <i>Ajo2</i>	IS	<i>A. johnsonii</i>	83.347-84.827	+	1.481	-	+	+	91	CP010351.1
Δ IS <i>Aba1</i>	Δ IS	<i>A. baumannii</i>	84.870-85.052	-	183	-	-	+	99	AY758396
IS <i>Aba1</i>	IS		106.434-	+	1.18	-	+	+	99	
ISPst3	IS	<i>P. stutzeri</i>	95.912-98.516	+	2.605	-	+	+	98	AB088753
IS <i>Abe18</i>	IS	<i>A. bereziniae</i>	108.755-110.024	+	1.269	GCTATAGGC	+	+	100	CM012183.1
Δ IS1006	Δ IS	<i>A. junii</i>	110.050-110.271	-	222	-	+	-	100	NC_004361
tipo- Δ IS5	Δ IS	<i>A. lwoffii</i>	110.272-110.778	+	507	-	-	+	99	KX528687.1
Δ Tn6018	Transposón incompleto	<i>A. baumannii</i>	56.125-58.074	+	1,960	-	+	-	99	FJ172370.5
Tn6637 ^e	Transposón compuesto	<i>A. bereziniae</i>	84.870-107.603	+	22.744	AATAAAGAT	+ ^f	+	100	CM012183.1

^aIS incompleta: Δ IS^bRepeticiones invertidas izquierda, “left” (IRl) y derecha, “right” (IRr): (+), presente; (-), no detectada.^cwww-is.biotoul.fr (Siguiet et al., 2006).^dDefectiva, debido a un codón de “stop” prematuro.^eTn6637 flanqueado por IS*Aba1*. La transposasa de la copia completa de IS*Aba1* sería responsable de la movilización del elemento por eventos de transposición reconociendo la IRr de la copia completa de IS*Aba1* y la IRl de Δ IS*Aba1*.^fIRl de Tn6637 es la IRr de Δ IS*Aba1*, la cual está en la hebra opuesta, según comparación con IS*Aba1*.

III.2.2.4.3.2. Caracterización de los plásmidos pAbe229-15 y pAbe229-9

Estudios recientes subrayan la presencia ubicua de plásmidos pequeños (2-10 kpb) en *A. baumannii*, sugiriendo que confieren ciertas ventajas adaptativas a cepas de ámbitos clínicos (Lean y Yeo, 2017). Estos elementos genéticos suelen contener genes que codifican funciones de movilización, sistemas TA, y replicasas de la superfamilia Rep-3 (Lean y Yeo, 2017). Aquí proponemos que pAbe229-15 (aun cuando sea mayor de 10 kpb) y pAbe229-9 podrían incluirse en esta categoría. El análisis de la secuencia nucleotídica de ambos plásmidos empleando diversas herramientas bioinformáticas permitió la identificación de genes correspondientes a las 4 regiones descriptas arriba para pAbe229-114, incluyendo las de replicación, estabilidad, transferencia y adaptabilidad.

En el caso de pAbe229-15, el gen *repB* codificante de una replicasa con dominio Rep-3 (pfam01051) se identificó empleando BlastX y Pfam. Esta proteína exhibe 100% de identidad aminoacídica con Rep de numerosos plásmidos presentes en *Acinetobacter* spp (WP_012780181.1; Fig. III.2.12.A; Tabla A.4), incluyendo *A. baumannii*, *A. bereziniae*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. pittii*, y *A. soli*. Por otra parte, análisis comparativos mostraron que RepB solo se encuentra en *Acinetobacter*, por lo que podría tratarse de una replicasa funcional sólo en este género. El sitio *oriV* fue buscado en el entorno genético inmediato de *repB* mediante la herramienta bioinformática Tandem Repeats Finder Program (ítem II.7.3, Mats. y Méts.). El mismo está compuesto por cuatro iterones perfectos consecutivos de 21 pb cuya secuencia es TAACTATGACGGATTGACTAC, ubicados corriente arriba de *repA* (círculo negro; Fig. III.2.12.A). La organización genética observada es coincidente con la reportada para plásmidos de *A. baumannii*, donde *repB* es precedido por tres a siete repeticiones directas perfectas o con pocas mutaciones (Lean y Yeo, 2017). La comparación de los iterones de pAbe229-15 contra la base de datos de secuencias iterónicas descrita (ítem III.2.2.2.3.1) reveló que el plásmido pMMD de una cepa clínica de *A. baumannii* (Merino et al., 2010) contiene iterones idénticos tanto en número como en secuencia a los presentes en pAbe229-15 y una replicasa que exhibe identidad aminoacídica del 99% con la presente en pAbe229-15. Estos resultados indican que la región de replicación que involucra *oriV-repB* se encuentra sometida a THG entre distintas especies de *Acinetobacter*. Genes que codifican para HigB2/HigA2 del sistema TA, que integran la región de estabilidad de pAbe229-15 se reconocieron a partir de análisis bioinformáticos empleando BlastX, RASTA-Bacteria y TADB (Fig. III.2.12.A; Tabla A.4). Es interesante destacar que genes homólogos están asimismo presentes en el plásmido pAbe229-114 (95% de identidad nucleotídica), sugiriendo la relevancia de este sistema TA en plásmidos de *A. bereziniae*. La región de transferencia incluyó al gen *mobA*, codificante de una relaxasa con dominio *mobA/mobL* (pfam03432), según BlastX y Pfam. MobA presentó 100% de identidad aminoacídica con MobA presente en *Acinetobacter* spp. (WP_012846858.1, Tabla A.4). Además, dicha relaxasa muestra 82% de identidad con MobA del plásmido pMAC de *A. baumannii*, elemento genético que ha sido profusamente caracterizado (Dorsey et al., 2006). A partir de la comparación de pAbe229-15 con la región de transferencia de pMAC se determinó el sitio de inicio de la transferencia u *oriT* (círculo naranja; Fig. III.2.12.A). Este sitio está compuesto por numerosas repeticiones directas e invertidas como así también por la región promotora de *mobA*. Estos sitios funcionarían como zonas de reconocimiento de proteínas de unión a ADN y facilitarían el acceso de proteínas específicas para producir el corte de la hebra necesario para el inicio de la transferencia de ADN (Dorsey et al., 2006). El gen *mobA* y el sitio *oriT* conforman la región de transferencia de pAbe229-15 (Fig.

III.2.12.A), en coincidencia con organizaciones genéticas similares señaladas por otros autores (Francia et al., 2004). Por último, la región de adaptabilidad identificada a partir de análisis por BlastX, Pfam y TCDB incluyó los genes *cre* (pfam01321; codificante de creatinasa), *yddG* (pfam00892; codificante de permeasa de la superfamilia DMT), *proP* (pfam07690; codificante de transportador de L-Prolina/glicinabetaína), y *glxA* (pfam01965; codificante de regulador transcripcional) (Fig. III.2.12.A; Tabla A.4). Estas proteínas están implicadas en el transporte y catabolismo de la creatinina, y el sistema está regulado mediante GlxA.

El análisis nucleotídico del plásmido pAbe229-9 permitió identificar el gen *repB* codificante de una replicasa con dominio Rep-3, que exhibe 100% de identidad aminoacídica con Rep de *A. pittii* PR331 (OTM21916.1; Tabla A.5), según BlastX y Pfam. Además, se detectó el sitio de inicio de replicación *oriV* corriente arriba de *repB* (círculo negro; Fig. III.2.12.B) empleando la herramienta Tandem Repeats Finder Program. Esta región se compone de cuatro iterones perfectos consecutivos de 22 pb, cuya secuencia es ACCTATACCACACCAAAAAGTC, localizados corriente arriba de *repB*. Se realizó una comparación de esta secuencia con la base de iterones (ítem III.2.2.2.3.2), siendo la identidad nucleotídica menor a 50% para todos los casos, mostrando así que iterones de pAbe229-9 no han sido descriptos en la base de datos mencionada.

Genes de estabilidad identificados como *splT* (pfam04365) y *sptA* (pfam14384) del sistema TA, y una toxina tipo-Doc (Fig. III.2.12.B; Tabla A.5) fueron reconocidos a partir de análisis por BlastX, Pfam, RASTA-Bacteria y TADB. Recientemente se describió que los genes *splTA* (por “small-plasmid toxin-antitoxin”) son elementos prevalentes en plásmidos de menos de 10 kpb de cepas clínicas MDR de *A. baumannii* (Jurenaite et al., 2013). Se les atribuyó un rol esencial en la estabilización de plásmidos, y en la contribución de la evolución de la resistencia a antibióticos en *A. baumannii* (Jurenaite et al., 2013). Por otro lado, en la región de transferencia se identificó el gen *mobA* (pfam03432) que exhibe una identidad nucleotídica de 94% con *mobA* del plásmido pAbe229-15. Asimismo, se detectó que el *oriT* es 100% idéntico al de pAbe229-15. Por tanto, la región de transferencia está conformada por *oriT-mobA* al igual que pAbe229-15, mostrando así regiones similares en ambos plásmidos. Por último, solo pudieron ser identificados los genes *ymdB* (pfam01661; codificante de una deacetilasa de O-acetil-ADP-ribosa) y *secC* (proteína quelante de zinc) correspondientes a la región de adaptabilidad (Fig. III.2.12.B; Tabla A.5).

Aun cuando ambos plásmidos pequeños carecen de genes atribuibles a resistencia a antimicrobianos, o a metales pesados, o a fagos, su presencia en la cepa estaría confiriendo replicones con capacidad de movilización aportada por la presencia en ambos de genes *mob* (Fig. III.2.12.), característica involucrada en la promiscuidad aportada por plásmidos

pequeños (Lean y Yeo 2017). Es importante destacar que las regiones de replicación de ambos plásmidos mostraron baja identidad de secuencia, posiblemente para minimizar el efecto de la competencia de cada replicasa en su unión a sus correspondientes sitios iterónicos (Bertini et al., 2010).

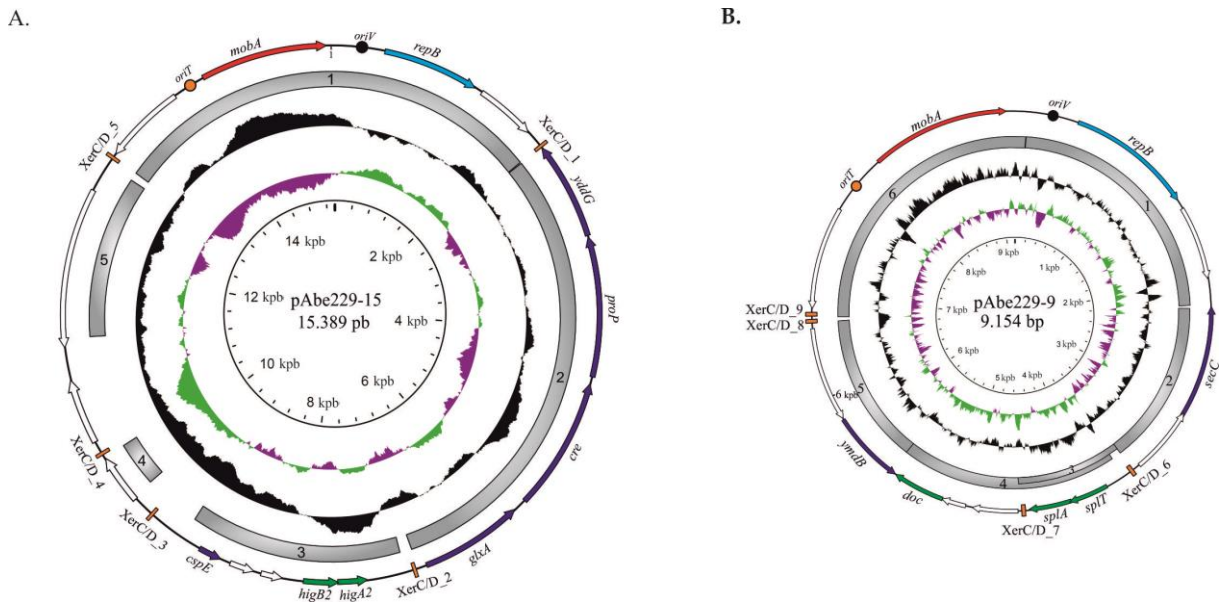


Figura III.2.12. Representación esquemática de pAbe229-15 (A.) y pAbe229-9 (B.). Para detalles, ver Fig. III.2.11. Los plásmidos no son mostrados en escala.

III.2.2.4.3.3. Caracterización de los plásmidos pAbe229-4 y pAbe229-1

En los últimos años han sido depositados numerosos genomas de *Acinetobacter* spp. en base de datos. La mayoría de dichas secuencias no están ensambladas completamente por lo que no es posible saber con precisión el número y tipo de plásmido que poseen. Aún más complejo es el panorama teniendo en cuenta que algunos sistemas de secuenciación desestiman “reads” de bajo tamaño por lo que los plásmidos pequeños son excluidos del análisis. A pesar de ello, estudios recientes proveen indicios de la variedad de plásmidos que existen en este género (Lean and Yeo, 2017), aunque la mayoría de los elementos genéticos estudiados derivan de cepas clínicas, y son portadores de marcadores de resistencia a antibióticos. Así, plásmidos que no contienen determinantes de resistencia son difícilmente seleccionados en ensayos de laboratorio, y por tanto sub-identificados. Menos aún se sabe de plásmidos pequeños de especies ambientales (o clínico-ambientales), como es el caso de *A. bereziniae*. En este contexto, se procedió al estudio de plásmidos más pequeños presentes en HPC229 que fueron detectados no solo por análisis *in silico* sino también visibilizados en la corridas electroforéticas de extractos plasmídicos digeridas con S1 (calle 2, Fig. III.2.9).

La presencia de genes *relE* (pfam15738)/*relB* (pfam04221) codificantes del sistema TA (RelEB), y *rimI* (pfam00583) de una N-acetiltransferasa putativa (Fig. III.2.13.A y Tabla A.6) ha sido puesta de manifiesta en pAbe229-4 mediante BlastX, RASTA-Bacteria, TADB y

Pfam. Similar análisis mostró que pAbe229-1 solo codifica para dos proteínas de función desconocida (Fig. III.2.13.B y Tabla A.7).

A pesar de que no pudieron detectarse genes codificantes de replicasas plasmídicas, algunas evidencias podrían indicar el origen de replicación de estos plásmidos, sugiriendo así posibles sitios que podrían ser reconocidos por replicasas presentes en otros replicones de HPC229. Ha sido reportado que los principales sitios de reconocimiento de replicasas son las secuencias repetitivas o iterones, y regiones de alto contenido de AT (Rajewska et al., 2012). En el caso de pAbe229-4, no se identificaron iterones mediante Tandem Repeat Finder. Sin embargo, se detectó una región rica en AT mediante el cálculo de GC “skew” acumulativo (*oriV*: triángulo negro, Fig. III.2.13.A), que correspondería al origen de replicación según la herramienta bioinformática GenSkew (ítem II.7.4, Mats. y Méts.). De manera similar, no se detectaron secuencias iterónicas en el caso de pAbe229-1. No obstante, se predijo la región *oriV* mediante GenSkew (*oriV*: triángulo negro, Fig. III.2.13.B).

El análisis global de pAbe229-4 mostró que, a pesar de no contener genes codificantes de replicasa y relaxasa, posee un sistema TA para la estabilización del plásmido. Los genes codificantes de sistemas TA están expuestos a THG vehiculizados por plásmidos o islas genómicas (Van Melderen y De Bast, 2009), por tanto la presencia del *relE/relB* estaría mostrando evidencias del armado quimérico de pAbe229-4, y aportando características que le otorgan estabilidad a un plásmido pequeño. Finalmente, el análisis de la secuencia de pAbe229-1 reveló ser un plásmido de reducido tamaño sin características funcionales conocidas. En este sentido, los plásmidos reportados hasta el momento de *A. baumannii* presentan entre 2 a 100 kpb (Lean and Yeo, 2017), por lo que pAbe229-1 representaría el elemento más chico reportado en *Acinetobacter* spp.

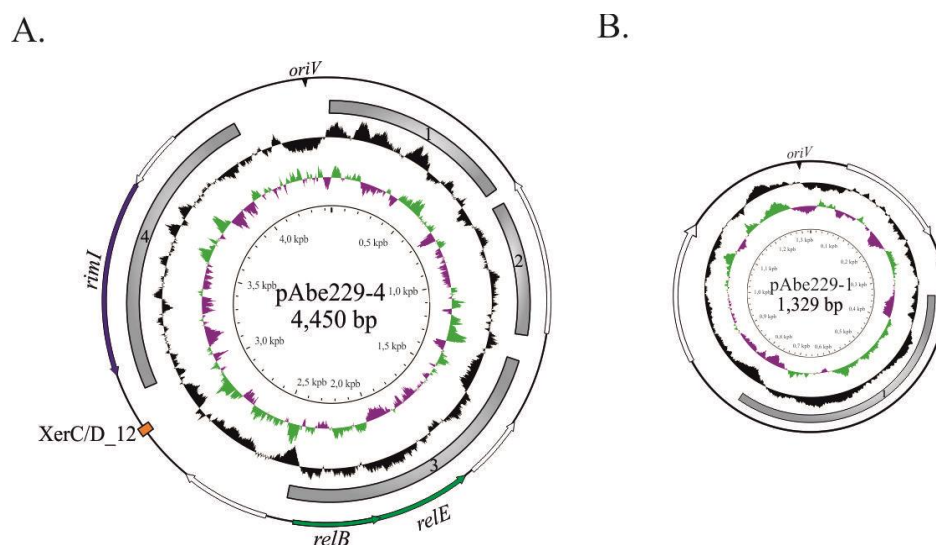


Figura III.2.13. Representación esquemática de pAbe229-4 (A) y pAbe229-1 (B). Para detalles, ver Fig. III.2.11. Triángulos negros, regiones putativas *oriV* predichas según “GC skew acumulativo”. Los plásmidos no son mostrados en escala.

III.2.2.4.3.4. Evaluación comparativa de plásmidos de HPC229 contra *Acinetobacter* spp.

Los plásmidos son EGM esenciales en la evolución y adaptación de los hospederos a medios ambientes fluctuantes (Fondi et al., 2010). El conocimiento del pan-plasmidoma de *Acinetobacter*, es decir, del pool completo de plásmidos albergados en diferentes miembros del género incluyendo especies asociadas a clínica humana como especies ambientales, es esencial para comprender la dinámica evolutiva del género (Fondi et al., 2010). En este contexto, se planteó el estudio comparativo de las secuencias de los plásmidos presentes en *A. bereziniae* HPC229 contra la base de datos de *Acinetobacter* spp., bajo el objetivo final de inferir hipótesis evolutivas del origen, y la construcción quimérica de la estructura de dichos EG asociada a su pasaje por distintos hospederos. Para ello, el análisis se realizará por un lado, contra base de datos de *Acinetobacter* spp considerando tanto cromosomas como plásmidos ensamblados completamente, a excepción de *A. bereziniae* (por esto, *Acinetobacter* no-*bereziniae*); y por otro lado, contra base de datos específica de *A. bereziniae*, incluyendo genomas no ensamblados, depositados como contigs (WGS por “whole genome sequencing”, NCBI). La comparación contra base de datos de *Acinetobacter* no-*bereziniae* permitirá evaluar regiones homólogas en otras especies del género, bajo la hipótesis general de que estos plásmidos son ampliamente diseminados dentro de *Acinetobacter* spp. Por su lado, la comparación específica de los plásmidos de HPC229 contra base de datos de *A. bereziniae* aportará información acerca de regiones de esta especie expuestas al intercambio genético intra-específico. Estos datos aportarán nuevo conocimiento, dado que al presente no se ha caracterizado el repertorio de plásmidos de *A. bereziniae* y solo se cuenta con las secuencias de los plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1}, pNDM229 de la cepa local (Brovedan et al., 2015) y pNDM-40-1 de la cepa clínica CHI-40-1 (Jones et al., 2015). Así, podrá evidenciarse, parcialmente, el genoma accesorio de *A. bereziniae*, y podrán poner de manifiesto potenciales eventos de THG entre cepas de esta especie; y con otras especies del género.

III.2.2.4.3.4.1. Evaluación comparativa de plásmidos de HPC229 contra *Acinetobacter* no-*bereziniae*

La comparación de las secuencias nucleotídicas de los plásmidos arriba descriptos contra base de datos de *Acinetobacter* no-*bereziniae* indicó que ninguno presentó homología completa con otros depositados, señalando que constituyen plásmidos no reportados previamente. Sin embargo, mostraron numerosas regiones que presentaron alta identidad nucleotídica (70-99%) con secuencias parciales de otros plásmidos (Figs. III.2.11, III.2.12, III.2.13, Tabla III.2.5). La comparación de cada región funcional de los plásmidos aportará información valiosa para inferir el origen de cada uno de los plásmidos de HPC229.

Tabla III.2.5. Regiones de homología de los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229 contra *A. no-bereziniae*

Plásmido	Posición (nt)	Fragmento (nt)	Región	Región funcional	Identidad nucleotídica (%) ^a	Origen (cepa, plásmido o cromosoma)	Número de acceso
pAbe229-114	111.696-1.554	3.868	1	Replicación y estabilidad	99	<i>A. venetianus</i> VE-C3, pAV3	NZ_ALIG01000010.1
	7.297-12.565	5.268	2	Adaptabilidad	95	<i>A. lwoffii</i> ZS207, pmZS	NZ_CP019144.1
	14.413-20.503	6.091	3	Adaptabilidad	95	<i>A. baumannii</i> LAC-4, cromosoma	NZ_CP007712.1
	20.504-36.960	16.457	4	Estabilidad y adaptabilidad	99	<i>A. venetianus</i> VE-C3, pAV3	NZ_ALIG01000010.1
	37.327-48.798	11.472	5	Adaptabilidad	99	<i>Acinetobacter</i> sp. WCHA45, cromosoma	NZ_CP028561.1
	51.114-58.084	6.971	6	Estabilidad y adaptabilidad	99	<i>A. lwoffii</i> ED9-5a, pALWED3.1	KX528687.1
	58.075-59.688	1.614			98		
	61.877-71.694	9.818	7	Adaptabilidad	95	<i>A. venetianus</i> VE-C3, pAV3	NZ_ALIG01000010.1
	72.546-78.258	5.713	8	Adaptabilidad	92	<i>A. venetianus</i> VE-C3, pAV3	
	81.384-82.478	1.097	9	Estabilidad	98	<i>A. pittii</i> AP_882, pOXA58-AP_882	CP014479.1
	85.054-96.889	11.836	10	Adaptabilidad	99	<i>A. johnsonii</i> XBB1, pXBB1-9	NZ_CP010351.1
	102.998-106.433	3.436	11	Adaptabilidad	99	<i>A. lwoffii</i> ED23-35, pALWED1.1	KX426227.1
pAbe229-15	106.430-108.753	1.14	12	Estabilidad	99	<i>A. venetianus</i> VE-C3, pAV3	NZ_ALIG01000010.1
	13.048-2.229	4.570	1	Replicación y transferencia	98	<i>A. baumannii</i> , pMMD	GQ904226.1
	2.176-6.882	4.706	2	Adaptabilidad	99	<i>A. baumannii</i> ABNIH28, pABA-2f10	NZ_CP026129.1
	7.000-9.169	2.169	3	Estabilidad y adaptabilidad	92	<i>A. baumannii</i> AR_0052, unnamed4	CP027186.1
	9.748-10.203	455	4	Desconocido	96	<i>A. pittii</i> WCHAP005046, pOXA58_005046	NZ_CP028573.1
pAbe229-9	11.351-13.008	1.657	5	Desconocido	78	<i>A. nosocomialis</i> 6411, cromosoma	NZ_CP010368.1
	1-2.132	2.132	1	Replicación	79	<i>A. venetianus</i> VE-C3, pAV1	DQ278485.1
	2.252-3.632	1.380	2	Adaptabilidad	82	<i>A. baumannii</i> ABNIH28, chr	NZ_CP026125.1
	3.621-4.516	895	3	Estabilidad	88	<i>A. venetianus</i> VE-C3, pAV1	NC_010309.1
	3.712-5.541	1.829	4	Estabilidad	99	<i>A. baumannii</i> D36, pD36-4	NZ_CP012956.1
	5.533-6.799	1.266	5		81	<i>A. baumannii</i> D36, pD36-4	
pAbe229-4	6.830-313	2.637	6	Transferencia	94	<i>A. baumannii</i> , pMMD	GQ904226.1
	1-692	691	1	Desconocido	70	<i>A. schindleri</i> ACE, p3AsACE	NZ_CP015618.1
	745-1.227	482	2	Desconocido	82	<i>Acinetobacter</i> sp. ACNIH2, pACI-235c	NZ_CP026414.1
	1.246-2.378	1.132	3	Estabilidad	87	<i>A. johnsonii</i> XBB1, pXBB1-4	NZ_CP010355.1
pAbe229-1	3.034-4.104	1.070	4	Adaptabilidad	70	<i>A. pittii</i> YMC2010/8/T346, cromosoma	NZ_CP017938.1
	330-795	465	1	Desconocido	87	<i>Acinetobacter</i> sp., pM131-11	NC_025117.1

^aSe muestran valores $\geq 70\%$ de identidad nucleotídica, y cobertura de 1.000 pb (para pAbe229-114) o 300 pb (para restantes); parámetros elegidos arbitrariamente.

III.2.2.4.3.4.1.1. Análisis comparativo de pAbe229-114

Las regiones de replicación y transferencia forman módulos definidos de acuerdo al esquema propuesto (Garcillán-Barcia et al., 2011) aunque no sucede lo mismo con las regiones de estabilidad y adaptabilidad, según ya fue expuesto (ítem III.2.2.4.3.1). Así, se encontraron genes que componen ambas regiones, dispersos a lo largo de todo el plásmido. Estas observaciones motivaron estrategias diferentes para el análisis de las regiones homólogas en *Acinetobacter* spp. Por un lado, se evaluaron las homologías correspondientes a módulos de replicación, e independientemente al de transferencia; y por otro lado, se evaluaron las homologías para cada uno de los segmentos genéticos incluidos en las regiones de estabilidad y adaptabilidad descritas (ítem III.2.2.4.3.1). El criterio empleado en las búsquedas de homologías se basó en identificar regiones de más de 1.000 pb (Tabla III.2.5). Se exceptuaron aquellos segmentos de entre 1.000 y 1.500 pb que incluyan solo secuencias de inserción, debido a que son EGM capaces de movilizarse extensamente a lo largo de los genomas, y no aportan evidencias de localización plasmídica.

El módulo de replicación *oriV-repB* mostró elevada identidad nucleotídica (99%) con el segmento correspondiente al plásmido pAV3 (region 1 parcial, Fig. III.2.11 y Tabla III.2.5) de la cepa *A. venetianus* VE-C3 aislada de aguas con desechos industriales (Fondi et al., 2013).

La comparación nucleotídica del segmento que contiene los genes *parA/parB* de la región de estabilidad (región 1 parcial) mostró una región homóloga en pAV3 (Tabla III.2.5). Por otra parte, tres de los cuatro sistemas TA presentes en pAbe229-114 (*hipA/hipB* y *fic/yhfG*, contiguos; e *higA/higB*) fueron asimismo detectados en pAV3, mostrando en todos los casos un 99% de identidad nucleotídica (regiones 4 y 12, respectivamente). Iguales resultados se observaron para la secuencia nucleotídica de pAV3, en la cual los genes codificantes de los sistemas HipA/HipB y Fic/YhfG se encuentran contiguos mientras que los codificantes de HigA/HigB se encuentran separados del resto de los TA, lo que indicaría un probable origen común para pAbe229-114 y pAV3. Por otro lado, los genes codificantes del sistema HigA2/HigB2 no se identificaron en pAV3, resultado que sugeriría que estos genes podrían haberse adquirido en pAbe229-114 por un evento diferente de THG luego de su pasaje por otro hospedador. En concordancia con esta hipótesis, se detectó una región conteniendo los genes codificantes de HigA2/HigB2 en el plásmido pOXA58-AP_882 de la cepa clínica *A. pittii* AP_882, detectada por la elevada homología entre ambas regiones (región 9, Tabla III.2.5). El módulo de transferencia incompleto de pAbe229-114 no fue detectado en *Acinetobacter* spp. sugiriendo su adquisición luego del pasaje del plásmido por

un hospedador no perteneciente al mismo género. En lo concerniente a genes con funciones asociadas a la región de adaptabilidad, los análisis comparativos mostraron segmentos génicos presentes en diferentes especies del género. El segmento de 5.268 pb que involucra a los genes tipo-*cadRA-feoAB* revelaron una elevada homología con una región homóloga del plásmido pmZS de *A. lwoffii* ZS207 (región 2, Tabla III.2.5), cepa aislada de una mina de oro en Polonia (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA359405>). Asimismo, el segmento de 6.091 pb que incluye los genes *cusFABC* de la bomba de eflujo tipo RND (región 3), mostró un 95% de identidad con la región homóloga detectada en la isla genómica GI2 localizada en el cromosoma de la cepa clínica hipervirulenta *A. baumannii* LAC-4 (Tabla III.2.5, Ou et al., 2015). Por último, la región de 8.585 pb que incluye los genes *cadAR* contenidos en el Tn6018, y los genes *nrpAB* (región 6) exhiben más del 98% de identidad nucleotídica con pALWED3.1 de *A. lwoffii* ED9-5a, cepa aislada de los sedimentos de capas de suelo congeladas (Tabla III.2.5, Mindlin et al., 2016). Otras regiones de adaptabilidad involucradas probablemente en la resistencia a estrés oxidativo, que incluyen los genes *msrA/grxC/selR*/tipo-*msrA* y tipo-*grxC/gstA/msrA2B/reIB* mostraron alta homología con segmentos nucleotídicos detectados en *Acinetobacter* sp. WCHA45 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/10146838>), así como en el plásmido pXBB1-9 de *A. johnsonii* XBB1 (Feng et al., 2015), ambas aisladas de aguas residuales (regiones parciales 5 y 10, respectivamente; Tabla III.2.5). Por su parte, la región flanqueada por *ISAbal2* y Δ *ISAbal22* de 3.436 pb, que contiene el gen *gshR* (región 11), se encuentra en pALWED1.1 de la cepa ambiental *A. lwoffii* ED23-35 (Tabla III.2.5; Mindlin et al., 2016). Por último, el *loci* codificante del sistema BREX involucrado en el mecanismo de defensa contra fagos (Goldfarb et al., 2015), mostró una identidad del 92% con la región homóloga del plásmido pAV3 de *A. venetianus* VE-C3 (regiones 7 y 8; Tabla III.2.5). Notablemente, la parte central del gen *pgIX* no se encuentra conservado entre ambas cepas. La variabilidad en este gen ya ha sido observada y está vinculada con una posible variación de fase en la actividad del sistema (Goldfarb et al., 2015). Es interesante notar que pAbe229 y pAV3 comparten una elevada homología en el módulo de replicación, en cuatro de los cinco segmentos genéticos de la región de estabilidad y en algunos segmentos incluidos en la región de adaptabilidad (Fig. III.2.11; y Tabla III.2.5). Teniendo en cuenta esta observación, se realizó una comparación completa entre los dos plásmidos mostrando en total un 50% de cobertura de secuencia, y sugiriendo en consecuencia un origen común entre ambos. Sin embargo, pAbe229-114 mostró regiones únicas incluyendo los genes codificantes de *HigA2/HigB2* del sistema TA, el sistema de conjugación truncado, como así también segmentos diversos de la región de adaptabilidad (Fig. III.2.11 y Tabla III.2.5).

En conclusión, el análisis comparativo contra la base de datos de *Acinetobacter* *no-bereziniae* permitió detectar numerosas regiones del plásmido que exhiben alta homología con secuencias presentes en más de una especie del género. Además, el análisis efectuado aporta evidencia de que pAbe229-114 tiene un esqueleto (Garcillán-Barcia et al., 2011) similar al de pAV3, considerando como esqueleto del plásmido las regiones de replicación, estabilidad y transferencia (Garcillán-Barcia et al., 2011). Sin embargo, regiones únicas fueron detectadas en pAbe229-114, confirmando que el pasaje del plásmido por distintos hospederos permite la adquisición de otros genes o segmentos de genes contribuyendo así a una nueva estructura química.

III.2.2.4.3.4.1.2. Análisis comparativo de pAbe229-15 y pAbe229-9

La caracterización de los plásmidos pAbe229-15 y pAbe229-9 mostró que los mismos son elementos capaces de replicación autónoma, y que poseen módulos de replicación completos y distintos entre sí (ítem III.2.2.4.3.2). Por el contrario, los módulos de transferencia son similares para ambos plásmidos, aun cuando los módulos de replicación y transferencia están contiguos (Fig. III.2.12). En lo que concierne a las regiones de estabilidad y adaptabilidad para ambos plásmidos, y de manera similar a lo descripto para pAbe229-114, no forman módulos sino que incluyen regiones no contiguas sugiriendo su adquisición en eventos independientes de THG. En este contexto, y semejante al criterio ya descripto para pAbe229-114 (ítem III.2.2.4.3.4.1.1) se efectuaron las búsquedas de regiones homólogas contra base de datos de *Acinetobacter* *no-bereziniae*, tomando en consideración regiones homólogas a los módulos de replicación y transferencia de ambos plásmidos, y a cada uno de los segmentos genéticos incluidos en las regiones de transferencia y estabilidad. El criterio empleado para estos plásmidos menores, incluye la búsqueda de regiones superiores a 300 pb, valor tomado arbitrariamente (Tabla III.2.5).

Se detectaron 5 y 6 regiones de homología en plásmidos pAbe229-15 y pAbe229-9, respectivamente (Fig. III.2.12 y Tabla III.2.5). En el primer caso, la región de 4.545 pb que contiene los módulos de replicación y transferencia de pAbe229-15 presentó un 99% de identidad nucleotídica con el plásmido pAP10253-1 portador de *bla*_{OXA-72} (región 1, Fig. III.2.12.A; Tabla III.2.5) de la cepa clínica *A. pittii* CCBH10253 (Chagas et al., 2017) lo que sugiere que el segmento que incluye los módulos de replicación y transferencia presentan un origen común, y se diseminan conjuntamente. La región de 2.169 pb que incluye los genes *higA2/B2* correspondientes a la región de estabilidad, y *cspE* de la región de adaptabilidad, mostró una identidad nucleotídica de 92% con el plásmido unnamed4 (región 3; Tabla III.2.5) de *A. baumannii* AR_0052 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP027186.1). Por su

parte, el segmento de 4.706 pb que contiene los genes implicados en el catabolismo de la creatinina presentó una región homóloga con el plásmido pABA-2f10 (región 2; Tabla III.2.5) de *A. baumannii* ABNIH28 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP026129.1>), mientras que las regiones desde nt 9.748-10.203, y 11.351-13.008 que contienen genes hipotéticos ubicados corriente abajo de *cspE* presentaron homología con segmentos de pOXA58_005046 (región 4; Tabla III.2.5) de la cepa clínica *A. pittii* WCHAP005046 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN08364583>), y del cromosoma (región 5; Tabla III.2.5) de la cepa clínica resistente a carbapenemes *A. nosocomialis* 6411 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/A.nosocomialis6411>), respectivamente. Es de destacar que la región que incluye el orf13 (10.203-11.350) no presentó secuencias homólogas en base de datos de genomas cerrados. Sin embargo, empleando BlastP se detectó un homólogo al producto hipotético de orf13 en la cepa portadora de *bla*_{NDM-1} *A. pittii* UKK-0538 (Tabla A.4), la cual posee genoma no ensamblado. Estos resultados muestran que pAbe229-15 es un elemento genético único, y quimérico. Esta última característica surge de la observación de regiones homólogas observadas en diferentes plásmidos derivados de cepas clínicas como ambientales del género *Acinetobacter*.

En el caso de pAbe229-9, el módulo de replicación de 2.033 pb presentó 81% de identidad nucleotídica con dicha región del plásmido pXBB1-5 (región 1, Fig. III.2.12.B; Tabla III.2.5) de la cepa *A. johnsonii* XBB1 aislada de aguas residuales de un ambiente hospitalario. Por otro lado, la región de estabilidad que incluye *sp/TA* y la toxina tipo-*doc*, así como el gen *ymdB* de la región de adaptabilidad presentaron elevada homología con diferentes regiones del plásmido pD36-4 (regiones 4 y 5) de la cepa multirresistente *A. baumannii* D36 (Tabla III.2.5; Hamidian et al., 2015). La región de adaptabilidad que incluye al gen *secC* mostró 82% de identidad nucleotídica con una región cromosomal de *A. baumannii* ABNIH28 (región 2; Tabla III.2.5). Por último, el módulo de transferencia de 2.637 pb que incluye *mobA* y *oriT* reveló una identidad nucleotídica de 94% con pAP10253-1 de la cepa *A. pittii* CCBH10253. Es de notar que esta última región es la misma que se describió en pAbe229-15 (región 5, Fig. III.2.12.A; Tabla III.2.5). Sin embargo, la región que comprende *oriV-repB* es distinta a la correspondiente a pAbe229-15 sugiriendo que pAbe229-9 podría haber sufrido eventos de recombinación entre *mobA* y *repB*, que conducen a la presencia de *mobA* similares en la misma cepa, aunque distintas *repB*, evitando así la incompatibilidad entre replicones. En síntesis, el plásmido pAbe229-9 es un plásmido nuevo compuesto por segmentos derivados de plásmidos de origen ambiental como clínico.

El análisis comparativo de pAbe229-15 y pAbe229-9 contra bases de datos de *Acinetobacter* spp. permitió detectar regiones de elevada identidad con secuencias presentes

en otros plásmidos o cromosomas de cepas tanto ambientales como clínicas. Estos resultados aportan evidencias acerca del origen común de ciertos módulos o regiones con otros EGM del género, y también su diseminación dentro del género *Acinetobacter*.

III.2.2.4.3.4.1.3. Análisis comparativos de pAbe229-4 y pAbe229-1

Se efectuaron las búsquedas de regiones homólogas de ambos plásmidos contra la base de datos de *Acinetobacter* no-*berezinae*, siguiendo los criterios definidos para pAbe229-15 y pAbe229-9 (ítem III.2.2.4.3.4.1.2).

El análisis comparativo de pAbe229-4 contra la base de datos de *Acinetobacter* spp. reveló cuatro segmentos de más de 400 pb de identidad significativa (Fig. III.2.13.A; Tabla III.2.5). Los genes *relE/relB* del sistema TA presentan homólogos (identidad de 87%) en el plásmido pXBB1-4 (región 3; Tabla III.2.5) de la cepa *A. johnsonii* XBB1 aislada de aguas residuales, mientras que la región que incluye al gen *rimI* mostró homología con una región cromosomal (región 4; Tabla III.2.5) de la cepa clínica *A. pittii* YMC2010/8/T346 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN05827444>).

En el caso de pAbe229-1 solo se detectó un segmento de 465 pb que exhibe 87% de identidad nucleotídica con una región del plásmido pM131-11 de *Acinetobacter* sp. (región 1, Fig. III.2.13.A y Tabla III.2.5). Sin embargo, no pudo ser detectado ningún gen con funciones conocidas por BlastX ni Pfam.

Así, estos plásmidos pequeños presentan escasos genes de reconocidas funciones, y su presencia en HPC229 es algo enigmática. Sin embargo, es de destacar la presencia del sistema *relB/relE* en pAbe229-4, sistema que confiere estabilidad a dicho elemento genético. Además, la purificación plasmídica seguida de corrida electroforética en geles de agarosa mostró bandas con elevada intensidad respecto al resto de los plásmidos (Fig. III.2.9), sugiriendo que ambos plásmidos podrían presentar elevado número de copias.

III.2.2.4.3.4.1.4. Identificación de sitios XerC/D en los plásmidos de HPC229

Numerosos trabajos recientes destacan la presencia de sitios de recombinación XerC/XerD en plásmidos de *Acinetobacter* spp., reconocidos por tirosín-recombinasas XerC y XerD (Blackwell y Hall, 2017; Cameranesi. et al., 2018, Mindlin et al., 2018). Estos sitios flanquean genes que confieren resistencia a antibióticos (Blackwell y Hall, 2017; Cameranesi. et al., 2018), o resistencia a metales tóxicos (Mindlin et al., 2018), y/o genes codificantes del sistema TA (Blackwell y Hall, 2017), y podrían ser movilizados como módulos discretos a través de eventos de recombinación sitio-específico mediados por recombinasas (Blackwell y Hall, 2017, Cameranesi. et al., 2018, Mindlin et al., 2018). Así, eventos de recombinación

podrían constituir otro mecanismo de diseminación de funciones adaptativas en las bacterias mediado por THG.

Los resultados expuestos de los análisis comparativos de los plásmidos de la cepa local con la base de datos de *Acinetobacter no-bereziniae* mostraron la presencia de regiones que exhiben un origen común con plásmidos de diferentes cepas de *Acinetobacter* spp. (Tabla III.2.5). Bajo la hipótesis de que regiones presentes en los plásmidos de HPC229 derivarían del intercambio entre plásmidos de diferentes miembros de *Acinetobacter* por procesos de recombinación mediados por recombinasas XerC y XerD, se investigó la presencia de sitios XerC/D a lo largo de las secuencias plasmídicas, con énfasis en la localización de los mismos bordeando segmentos específicos. Para este propósito, el patrón ambiguo NNTNYKYATAANNNNYWTTATSTKAWNN donde Y=C/T, K=G/T, W=A/T, S=G/C, N=A/T/C/G (ítem II.7.7, Mats. y Méts.), inferido de 19 secuencias de reconocimiento XerC/D presentes en los plásmidos de la cepa clínica *A. baumannii* Ab242 (Cameranesi et al., 2018), se usó como molde para la búsqueda de los sitios en los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229 a través de la herramienta bioinformática fuzznuc (<http://bioinfo.nhri.org.tw/cgi-bin/emboss/fuzznuc>; ítem II.7.7, Mats. y Méts.). El análisis comparativo de las secuencias detectadas mediante esta herramienta, y una posterior inspección manual de las regiones de replicación, estabilidad, transferencia y adaptabilidad de los plásmidos permitirían la identificación de sitios adicionales que no se detectan con el patrón inicialmente adoptado.

La búsqueda de sitios XerC/D en el plásmido pAbe229-114 mostró dos sitios (Fig. III.2.11 y Tabla III.2.6), XerC/D₁₀, localizado entre los nt 59.663-59.690, detectado mediante el empleo de fuzznuc, y XerC/D₁₁, localizado entre los nt 82.467-82.494, por inspección manual. En el primer caso, los sitios XerC/XerD están compuestos por secuencias conservadas de 11 pb cada uno, y la región central (cr) por 6 pb, totalizando 28 pb (Tabla III.2.6). En el segundo caso, XerD, de 11 pb, se encuentra conservado mientras que XerC contiene algunas mutaciones por lo que no fue reconocido inicialmente por el patrón utilizado empleando fuzznuc (Tabla III.2.6). Coincidiendo con el anterior, la región central contiene 6 pb, así totalizando 28 pb. Este sitio ha sido reconocido mediante el análisis comparativo contra la base de datos de *Acinetobacter no-bereziniae*, dado que los genes *higA2/higB2* de la región homóloga detectada en pOXA58-AP₈₈₂ de *A. pittii* AP₈₈₂ (Tabla III.2.5) se encuentran flanqueados por sitios XerC/D conservados (región 9, Fig. III.2.11; Tabla III.2.5). Así, el alineamiento de las regiones que contienen tanto los genes *higA2/higB2* como así también el entorno genético inmediato de los plásmidos pAbe229-114 y pOXA58-AP₈₈₂ reveló la presencia de XerC/D₁₁ en pAbe229-114, el cual posee algunas mutaciones en XerC respecto al sitio homólogo de pOXA58-AP₈₈₂, mientras que el segundo sitio XerC/D

detectado en pOXA58-AP_882 que conforma un módulo al flanquear *higA2/higB2* se encuentra en pAbe229-114 casi en su totalidad mutado y probablemente no funcional. Este resultado sugiere que el sistema TA mencionado podría haberse adquirido inicialmente por pAbe229-114 a través de un mecanismo de recombinación, seguido de la pérdida (o mutación) del segundo sitio XerC/D. Por otra parte, el análisis comparativo realizado (ítem III.2.2.4.3.4.1.1) permite reconocer que los sitios XerC/D_10 y XerC/D_11 (XerC/D_10-11) constituirían un módulo discreto no presente como tal en *Acinetobacter* spp. Esto se deduce de la carencia de una región homóloga única desde el nt 59.663 (inicio de XerC/D_10) hasta el nt 82.494 (final de XerC/D_11) según BlastN contra *Acinetobacter* no-*bereziniae* (regiones 7, 8 y 9, Fig. III.2.11). En conjunto, estos resultados sugieren la formación de un nuevo módulo en pAbe229-114 con la potencialidad de diseminar el sistema BREX-1 como así también los genes *higA2/higB2* del sistema TA (Fig. III.2.11).

Cinco sitios XerC/D han sido reconocidos en pAbe229-15, de los cuales cuatro (XerC/D_1-4, Fig. III.2.12.A; Tabla III.2.6) fueron detectados empleando fuzznuc, mientras que el restante por inspección manual (XerC/D_5, Tabla III.2.6). En los primeros cuatro casos (XerC/D_1-4), los sitios XerC/D son de 11 pb de longitud cada uno, que exhiben la secuencia conservada de acuerdo al patrón sugerido (Cameranesi et al., 2018), y contienen 6 pb en la región central. En el restante, los sitios XerC/D se encuentran conservados aunque la región central contiene 7 pb, por lo que el sitio XerC/D_5 de 29 pb en total, no es reconocido con el patrón recomendado. Es interesante notar que los sitios XerC/D_5 (nt 13.062-13.090) y XerC/D_1 (nt 2.174-2.201) flanquean los módulos de transferencia y replicación (Fig. III.2.12.A). El análisis comparativo de pAbe229-15 contra *Acinetobacter* no-*bereziniae* (ítem III.2.2.4.3.4.1.2) mostró que dichos módulos (región 1, Fig. III.2.12.A) presentan homología con la región correspondiente al plásmido pAP10253-1 de *A. pittii* CCBH10253 (Tabla III.2.5). El análisis de este segmento mostró por un lado, un sitio XerC/D idéntico a XerC/D_5 salvo que la región central en pAP10253-1 contiene 6 pb y por otro lado, un sitio XerC/D con tan solo una mutación, en el sitio XerC, respecto a XerC/D_1. Estas observaciones permiten hipotetizar que los módulos contiguos de transferencia y replicación, bordeados por XerC/D_5 y XerC/D_1, podrían movilizarse por eventos de THG entre plásmidos de *Acinetobacter* spp. (e.g. *A. pittii* y *A. bereziniae*), y estar sujetos a eventos de recombinación mediados por recombinasas XerC y XerD. Un análisis similar se realizó para regiones flanqueadas por XerC/D_1-2 (región 2), XerC/D_2-3 (región 3), y XerC/D_3-4 (región 4) detectadas a partir de los análisis comparativos contra *Acinetobacter*-no-*bereziniae* (Fig III.2.12.A; Tabla III.2.5). Los sitios XerC/D_1 y XerC/D_2 (nt 6.904-6.931) flanquean genes implicados en el metabolismo de la creatinina, y fueron detectados también bordeados

por sitios XerC/D en pABA-2f10 de *A. baumannii* (región 2, Tabla III.2.5). Por su parte, los sitios XerC/D_2 y XerC/D_3 (nt 9.477-9.504) flanquean los genes *higA2/higB2* del sistema TA de la región de estabilidad de pAbe229-15. La región homóloga identificada en el plásmido unnamed4 *A. baumannii* AR_0052 mostró idéntico sitio XerC/D_2, y ausente XerC/D_3 (región 3, Tabla III.2.5). Los sitios XerC/D_3 y XerC/D_4 (nt 10.204-10.231) flanquean un marco de lectura hipotético siendo esta región detectada parcialmente en pOXA58_005046 de *A. pittii* WCHAP005046, aunque en este último el sitio XerC/D_3 no se encuentra presente (región 3, Tabla III.2.5). Por último, la región que involucra a los sitios XerC/D_4 y XerC/D_5 no fue detectada en ningún plásmido de *Acinetobacter no-bereziniae*. Tomados estos datos en conjunto, se hipotetiza que la arquitectura de pAbe229-15 estaría asociada a eventos de recombinación sitio-específico que modelaron la unión de diferentes módulos bordeados por sitios XerC/D.

En el plásmido pAbe229-9 fueron reconocidos cuatro sitios XerC/D, de los cuales tres (XerC/D_6, XerC/D_7 y XerC/D_9, Fig. III.2.12.B; Tabla III.2.6) fueron detectados por fuzznuc mientras que el restante por inspección manual (XerC/D_8, Tabla III.2.6). Los sitios XerC/D_6, XerC/D_7 y XerC/D_9 presentan 11 pb de longitud que exhiben la secuencia conservada de acuerdo al patrón sugerido (Cameranesi et al., 2018), y contienen 6 pb en la región central. En el caso de XerC/D_8, los sitios no se encuentran conservados respecto a lo reportado (Cameranesi et al., 2018) y además, la región central contiene 5 pb por lo que XerC/D_8, de 27 pb en total, no es reconocido con el patrón sugerido (Cameranesi et al., 2018). Este último sitio fue identificado a través de los análisis comparativos contra *Acinetobacter no-bereziniae*, según pudo deducirse de la región homóloga a los genes *splTA*, *doc* y *ymdB* identificada en el plásmido pD36-4 de *A. baumannii* D36 (región 4 y 5, Tabla III.2.5). Se observó que la región 5 termina en el nt 6.799 mientras que XerC/D_8 se ubica entre los nt 6,778-6,804 sugiriendo así, que un evento de recombinación y posteriores mutaciones en XerD generaron un sitio XerC/D distinto en pAbe229-9. Sin embargo, en el plásmido pD36-4 no fue detectado ningún sitio XerC/D corriente arriba de *splTA*, sugiriendo una posible evolución en pAbe229-9 en el cual se encontraron dos sitios XerC/D corriente abajo de la toxina *doc*. En este sentido, se observa que los genes *splT/splA* que se encuentran flanqueados por los sitios XerC/D_6 (nt 3.622-3.649, Fig. III.2.12.B) y XerC/D_7 (nt 4.473-4.500, Fig. III.2.12.B), se detectaron en pAV1 de *A. venetianus* VE-C3 (región 3, Fig. III.2.12.B, Tabla III.2.5). Esta observación permite hipotetizar que la prevalencia de este sistema TA en distintos plásmidos pertenecientes a miembros de *Acinetobacter* (Jurenaite M et al., 2013) podría explicarse en parte, debido a la presencia de sitios XerC/D que flanquean estos genes. Por último, análisis comparativos similares a los efectuados con pAbe229-15 no

permitieron identificar módulos completos flanqueado por los sitios XerC/D₉ (nt 6.828-6.855, Fig. III.2.12.B) y XerC/D₆, indicando que las regiones de transferencia y replicación en pAbe229-9 forman una plataforma no reportada previamente, y mostrarían capacidad para ser diseminadas a través de eventos de recombinación mediados por recombinasas XerC y XerD.

En el plásmido pAbe229-4 fue identificado un solo sitio XerC/D (XerC/D₁₂, ubicado entre nt 2.889-2.916, Fig. III.2.13.A; Tabla III.2.6) mediante la herramienta fuzznuc, siendo XerC y XerD de 11 pb de longitud y conteniendo 6 pb en la región central. Como en este caso solo hay un solo sitio XerC/D, este elemento podría ser necesario para la resolución plasmídica luego del proceso de replicación, como es sugerido para los cromosomas (Midonet y Barre, 2014).

Por último, no fue detectado ningún sitio XerC/D en el plásmido pAbe229-1 como tampoco en pNDM229 (Brovedan et al., 2015) sugiriendo que estos sitios aportan una estrategia adicional importante para la diseminación de módulos con genes de funciones conocidas.

En síntesis, se reconocieron en total 12 sitios XerC/D en los plásmidos de HPC229, 5 en pAbe229-15; 4 en pAbe229-9; 2 en pAbe229-114; y 1 en pAbe229-4 (Tabla III.2.6). Diez de estos sitios tienen un cr de 6 nucleótidos de longitud (cr₆). Estos resultados nos llevaron a generar un consenso nuevo para los sitios XerC/D que poseen cr₆ en *A. bereziniae* HPC229 (Tabla III.2.6). Como se observó para los plásmidos Ab242 (Cameranesi et al., 2018), el motivo reconocido por XerD muestra más conservación que el equivalente de XerC, mientras que el cr no muestra preservación. Además, sitios XerC/D que contienen cr de 5 o 7 nucleótidos de longitud también pudieron ser predichos (Tabla III.2.6). En este sentido, se han informado sitios putativos XerC/D con longitudes de cr distintas a 6 nucleótidos (*e.g.* 5 en *A. johnsonnii*; Feng et al., 2015) y otras bacterias (Midonet et al., 2014) lo que sugiere que estos plásmidos podrían exponerse a eventos de recombinación en diferentes hospederos. Además, tres de los plásmidos de la cepa local HPC229 son portadores de más de un sitio de reconocimiento XerC/D, lo que sugiere que podrían mediar su diseminación a través de recombinación sitio específica y posible formación de cointegrados (Cameranesi et al., 2018). Por último, es importante destacar que estos estudios proveen evidencias de la posible diseminación de módulos flanqueados por sitios XerC/D, por su hallazgo en diferentes especies. Más aún, la portación de numerosos sitios XerC/D dentro de la estructura de cada plásmido permite inferir que múltiples eventos de recombinación son posibles, constituyéndose este sistema en un elemento que puede otorgar plasticidad genética a la bacteria.

Tabla III.2.6. Sitios XerC/D detectados en los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229

Plásmido	Sitio XerC/D ^a	Secuencia nucleotídica ^b			Longitud cr (pb)	Posición (inicio-final)	Método de búsqueda ^c
		XerC	cr	XerD			
pAbe229-15	XerC/D_1	·c···	6	2.174-2.201	*
	XerC/D_2	g.....	cc···	6	6.904-6.931	*
	XerC/D_3	·c···tc···	·a·a·t	6	9.477-9.504	*
	XerC/D_4	·c···tc···	·a·a·t	6	10.204-10.231	*
	XerC/D_5	·a···aac···	tac·c·a	·····cg···	7	13.062-13.090	**
pAbe229-9	XerC/D_6	g.....	c··cc·	6	3.622-3.649	*
	XerC/D_7	·c····c···	·t···	······t·	6	4.473-4.500	*
	XerC/D_8	·····a····	atca·-	····a·gg·a	5	6.778-6.804	**
	XerC/D_9	········	·a·a·t	·······g·	6	6.828-6.855	*
pAbe229-114	XerC/D_10	········	·t···	······t·	6	59.663-59.690	*
	XerC/D_11	taac··a···	c·ccc·	······t·	6	82.467-82.494	**
pAbe229-4	XerC/D_12	········	c·t·c·	······t·	6	2.889-2.916	*
consenso ^e		atttCgtATAA	ggggta	TTATGTTAAaT			

^aLos número asignados a los diferentes sitios XerC/D fueron elegidos arbitrariamente.

^bSe indica con un punto (.) la presencia del mismo nt en cada una de las posiciones dentro de un sitio XerC/D respecto del consenso. De lo contrario, el nt correspondiente se indica en letras minúsculas.

^cLos sitios XerC/D en los plásmidos de HPC229 fueron detectados por Fuzznuc usando como "query" NNTNYKYATAANNNNYWTATSTKAWN (*). (ítem II.7.7, Mats. y Méts.), o por inspección visual (**).

^dConsenso generado de los sitios XerC/D identificados en los plásmidos de HPC229. Fueron considerados solo los sitios con cr de 6 nt. Ver texto para detalles.

III.2.2.4.3.4.2. Evaluación comparativa de los plásmidos de HPC229 contra la base de datos de *A. bereziniae*

A. bereziniae es una especie recientemente caracterizada (Nemec et al., 2010), y al presente hay aún escasa información de su implicancia en la clínica. La aparición de la cepa local HPC229 portadora de un plásmido (pNDM229) con el gen *bla*_{NDM-1} motivó el estudio del contenido plasmídico de esta cepa, y el análisis comparativo de los genomas disponibles de *A. bereziniae* para evidenciar sobre la capacidad de esta especie ambiental para adaptarse a diversos nichos ambientales como clínicos. Se encuentran disponible siete genomas de *A. bereziniae*, incluido el genoma de la cepa local HPC229 reportado recientemente por nuestro grupo (Brovedan et al., 2016), según lo que se observa en base de datos del NCBI (GenBank). Sin embargo, solo el genoma de la cepa XH901 fue ensamblado completamente, mientras que el resto se encuentran parcialmente ensamblados en contigs (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/acinetobacterbereziniae>). Entre ellos, sólo la cepa local HPC229 como la cepa CHI-40-1 evidenciaron la presencia de plásmidos, según los reportes correspondientes (Jones et al., 2015; Brovedan et al., 2015). Así, análisis comparativos de los plásmidos de HPC229 contra la base de datos de los genomas disponibles

de *A. bereziniae* proveerán conocimiento sobre la presencia de plásmidos putativos en esta especie, y finalmente sobre el plasmidoma del género *Acinetobacter*, en un intento de aportar conocimiento sobre características adaptativas que diferencian cepas (o especies) ambientales de clínicas.

III.2.2.4.3.4.2.1. Afiliación de cepas de *Acinetobacter* spp. como *A. bereziniae*

Numerosos estudios han mostrado el uso del gen codificante de la subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*) en la identificación y clasificación taxonómica de numerosas especies bacterianas incluyendo a *Acinetobacter* (La Scola et al., 2006). La investigación sistemática de homólogos del gen *rpoB* de la cepa tipo CIP 70.12 de *A. bereziniae* contra la base de datos de *Acinetobacter* spp. del NCBI (GenBank) distinguió dos cepas depositadas como *Acinetobacter* sp. con identidad mayor al 98%, incluyendo la cepa clínica WC-743, y la cepa Ag2 derivada de intestino de mosquito. Este resultado indica que existen dos cepas que pertenecerían a la especie *A. bereziniae* tomando en consideración que pertenecerían a la misma especie aquellas que presentan una identidad superior al 95% (La Scola et al., 2006). Sin embargo, la delineación de especie bacteriana se efectúa actualmente a través de diferentes metodologías que incluyen MALDI-TOF, MLSA, como así también técnicas de análisis de genomas *in silico* (Mulet et al., 2013; Lee et al., 2016). Entre estas últimas, la determinación del parámetro orthoANI (por “orthology Average Nucleotide Identity”; ítem II.7.8, Mats. y Méts.) es una de las metodologías más precisas (Lee et al., 2016). Por ello, en este trabajo se determinaron los valores de orthoANI de la cepa de referencia de la especie *A. bereziniae* (CIP 70.12; Nemec et al., 2010) contra los dos genomas de *Acinetobacter* sp. en estudio (WC-743 y Ag2) así como contra los genomas depositados en base de datos como *A. bereziniae*, para confirmar su afiliación a esta especie. Asimismo, se estableció el valor de orthoANI de la cepa de referencia contra los genomas de las cepas tipo de *A. guillouiae* y *A. gernerii*, como controles de especies filogenéticamente relacionadas (Tabla III.2.7). Los resultados mostraron valores superiores al 97% entre cualquiera de los genomas de *A. bereziniae* incluyendo las dos cepas de *Acinetobacter* sp. (Tabla III.2.7), y menor al 82% con las especies más cercanas (*A. guillouiae* y *A. gernerii*; Tabla III.2.7). Así, este análisis permitió asignar 2 cepas depositadas como *Acinetobacter* sp. a la especie *A. bereziniae*, y confirmar a las restantes como pertenecientes a esta especie. Por tanto, se incluirán los genomas de las cepas WC-743 y Ag2 a las 7 cepas ya asignadas como *A. bereziniae*, para los restantes análisis informáticos (Tabla III.2.7).

Tabla III.2.7. Cepas de *A. bereziniae* en estudio y cepas controles (de especies relacionadas filogenéticamente).

Cepa	Fuente de aislamiento	Fecha de aislamiento	País	Número de acceso	orthoANI ^a
<i>A. bereziniae</i> HPC229	Sangre	2014	Argentina	LKDJ01	98.20
<i>A. bereziniae</i> CHI-40-1	Pus	2005	India	CDEL01	98.11
<i>A. bereziniae</i> CIP 70.12 ^T	Herida	1960	-	APQG01	100.00
<i>A. bereziniae</i> NIPH 3	Ambiente hospitalario	1991	Rep. Checa	APPK01	97.90
<i>A. bereziniae</i> 507_ABAU	Espuito	2012	Estados Unidos	JVEK01	98.05
<i>A. bereziniae</i> KCTC 23199	Herida	1960	Suecia	BBLJ01	99.96
<i>A. bereziniae</i> XH901	Sangre	2016	China	CP018259	98.24
<i>Acinetobacter</i> sp. WC-743	Ambiente hospitalario	2008	Estados Unidos	AMFQ01	98.06
<i>Acinetobacter</i> sp. Ag2	Intestino de mosquito	2014	Estados Unidos	LBNA01	98.28
<i>A. guillouiae</i> CIP 63.46 ^T	Aguas residuales	1951	-	APOS01	82.72
<i>A. gerneri</i> DSM 14967 ^T	Aguas residuales	1991	Australia	APPN01	76.05

^aValores obtenidos del cálculo de orthoANI entre cada genoma con el correspondiente a la cepa de referencia de *A. bereziniae* (CIP 70.12).

^TCepas de referencia.

-No especificado.

III.2.2.4.3.4.2.2. Análisis comparativos contra la base de datos de *A. bereziniae*: criterios empleados

Análisis comparativos de los plásmidos de HPC229 contra la base de datos de *Acinetobacter* no-*bereziniae* mostraron que las regiones de replicación, estabilidad, transferencia y adaptabilidad de pAbe229-114, pAbe229-15 y pAbe229-9 se encuentran representadas en diferentes especies de *Acinetobacter*, mientras que escasas regiones de fueron detectadas en pAbe229-4 y pAbe229-1 (ítem III.2.2.4.3.4.1). Se planea aquí efectuar la búsqueda de regiones homólogas contra la base de datos de *A. bereziniae* a fin de determinar secuencias nucleotídicas comunes entre los miembros de esta especie que permitan hipotetizar acerca del origen común y/o la transferencia horizontal de regiones génicas, así como el hallazgo de características propias de esta especie. La herramienta bioinformática utilizada para los análisis comparativos como así también para su esquematización fue GCview (ítem II.7.4, Mats. y Méts.; Grant y Stothard, 2008). El criterio de la búsqueda fue análogo a lo que se expuso anteriormente (ítems III.2.2.4.3.4.1.1 y III.2.2.4.3.4.1.2), por tanto se tuvieron en cuenta regiones ≥ 1.000 pb para el caso de pAbe229-114, y ≥ 300 pb para el resto de los plásmidos; con identidades superiores al 70% en todos los casos (Fig. III.2.14; Tabla III.2.8). Así, los distintos segmentos de homología de los plásmidos de HPC229 respecto a los genomas de *A. bereziniae* de este estudio fueron esquematizados como arcos de colores (Fig. III.2.14). Además, debido a que estudiamos características codificadas en plásmidos, se excluyó el genoma de la cepa XH901 debido a que solo fue reportada la secuencia nucleotídica correspondiente a cromosoma.

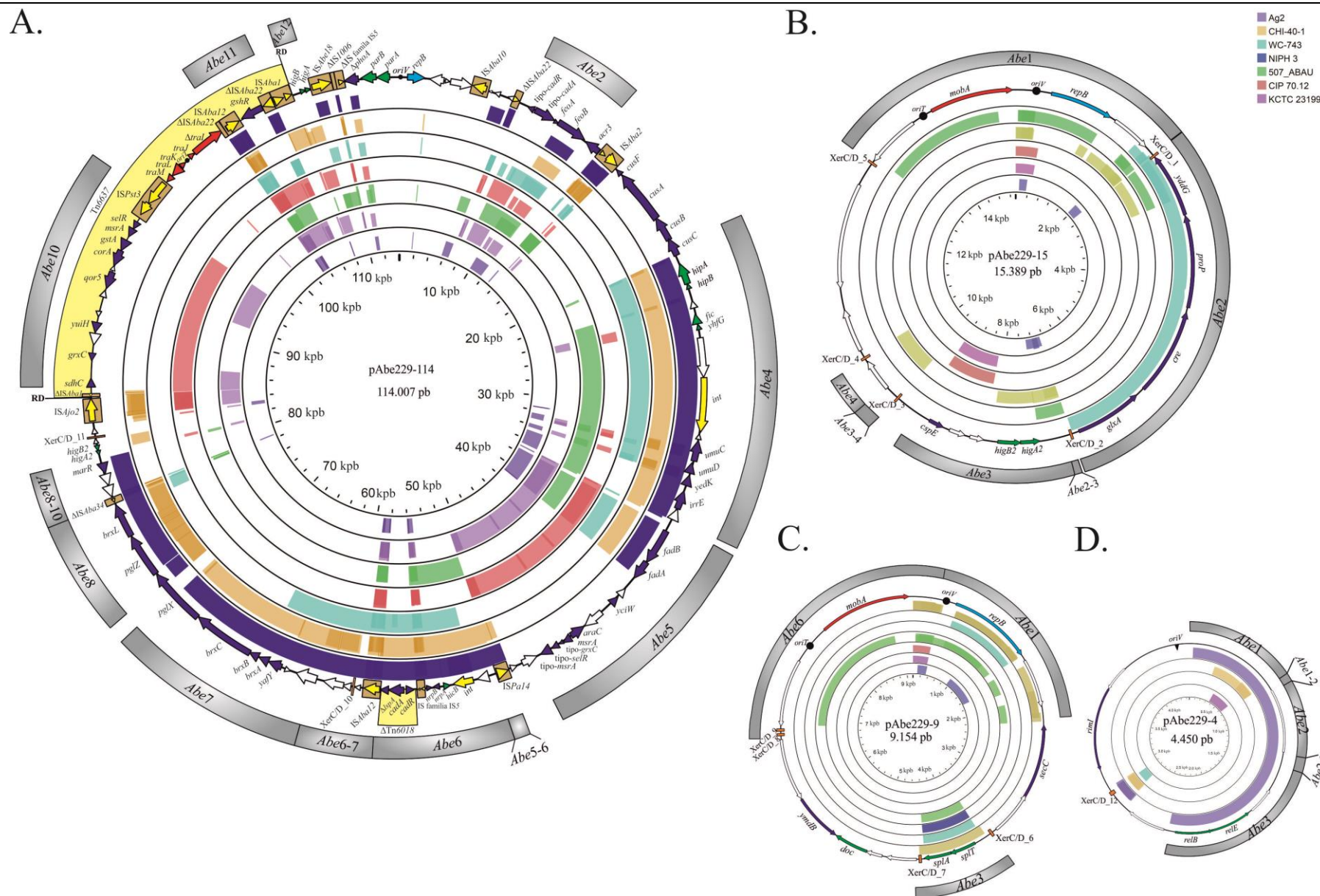


Figura III.2.14. Representación esquemática resultante de la comparación de mapas genéticos circulares de pAbe229-114, pAbe229-15, pAbe229-9, pAbe229-4 y pAbe229-1 contra genomas de *A. bereziniae* (y *A. no-bereziniae*) mediante GCview. Anillos exteriores cerrados: secuencias codificantes de cada plásmido. Anillos internos con arcos de colores: regiones de homología obtenidas del análisis por BlastN contra genomas de *A. bereziniae* (ítem II.7.4, Mats. y Méts.), ordenados en cada caso, desde el plásmido que muestra mayor extensión a menor extensión de regiones homólogas (ver también Tabla III.2.8). Los diferentes colores de los arcos corresponden a cada una de las cepas indicadas en el extremo superior derecho de la figura. Altura de los arcos de color en los anillos: porcentaje de identidad nucleotídica (mayor identidad se indica con mayor altura del arco). Regiones con identidades nucleotídicas $\geq 70\%$ y una longitud de alineamiento mínima de 1.000 pb (para el caso de pAbe229-114) o 300 bp (para pAbe229-15, pAbe229-9 y pAbe229-4) se detallan en Tabla III.2.8. Regiones de los arcos de colores que se observan con mayor intensidad de color: segmentos de los plásmidos de HPC229 presentes en múltiples regiones en el genoma de la cepa correspondiente de *A. bereziniae*. Los arcos grises externos a los mapas genéticos circulares de los plásmidos de HPC229 (Abe1-12) indican regiones homólogas con las descritas para plásmidos de HPC229 contra regiones de plásmidos/cromosomas de cepas de *Acinetobacter no-bereziniae* (regiones 1-12, gris en gradiente, Figs III.2.11, III.2.12 y III.2.13; Tabla III.2.5); regiones Abe5-6, Abe6-7, Abe8-10, Abe 3-4, Abe1-2, y Abe2-3 (gris oscuro) indican regiones homólogas de plásmidos HPC229 con regiones de *A. bereziniae*, no presentes en *Acinetobacter no-bereziniae* (ver texto).

Tabla III.2.8. Regiones de homología entre los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229 con genomas de *A. bereziniae* de este estudio

Plásmido	Posición (nt)	Fragmento (nt)	Nombre de región	Región funcional	Identidad nucleotídica (%) ^a	Origen (cepa)	Número de acceso NCBI (GenBank)	Cobertura total (nt)
pAbe229-114	20.504-36.960	16.456	Abe4	Estabilidad y adaptabilidad	99	NIPH3	APPK01000003.1	47.779
	37.431-40.931	3.500	Abe5*	Adaptabilidad	86		APPK01000060.1	
	51.114-53.896	2.782	Abe6*	Adaptabilidad	97		APPK01000003.1	
	54.413-71.707	17.593	Abe6*; Abe6-7; Abe7*	Adaptabilidad	98		APPK01000004.1	
	73.566-81.014	7.448	Abe8; Abe8-10	Adaptabilidad	99		APPK01000004.1	
	20.504-36.960	16.456	Abe4	Estabilidad y adaptabilidad	94	CHI-40-1	CDEL01000167.1	42.386
	37.431-40.929	3.498	Abe5*	Adaptabilidad	86		CDEL01000296.1	
	51.114-53.998	2.884	Abe6*	Adaptabilidad	99		CDEL01000167.1	
	53.998-58.165	4.167	Abe6*	Estabilidad y adaptabilidad	98		CDEL01000167.1	
	59.646-61.052	1.406	Abe6*; Abe6-7	Adaptabilidad	97		CDEL01000305.1	
	61.089-63.912	2.823	Abe6-7; Abe7*	Adaptabilidad	99		CDEL01000063.1	
	63.854-71.428	7.574	Abe7*	Adaptabilidad	92		CDEL01000026.1	
	72.538-74.328	1.790	Abe8*	Adaptabilidad	90		CDEL01000300.1	
	76.598-78.386	1.788	Abe8*	Adaptabilidad	92		CDEL01000225.1	

Tabla III.2.8 (cont.)

pAbe229-15	8.638-11.719	3.081	Abe2*	Adaptabilidad	77	WC-743	AMFQ01000090.1	33.324
	20.504-23.881	3.377	Abe4*	Estabilidad	98		AMFQ01000055.1	
	23.875-34.350	10.475	Abe4*	Estabilidad y adaptabilidad	98		AMFQ01000007.1	
	37.431-40.929	3.498	Abe5*	Adaptabilidad	86		AMFQ01000023.1	
	52.562-61.354	8.792	Abe6*; Abe6-7; Abe7*	Estabilidad y adaptabilidad	97		AMFQ01000126.1	
	61.348-65.449	4.101	Abe7*	Adaptabilidad	99	CIP 70.12	AMFQ01000094.1	30
	7.847-9.642	1.795	Abe2*	Adaptabilidad	99		APQG01000008.1	
	36.962-50.325	13.363	Abe5	Adaptabilidad	99		APQG01000004.1	
	84.864-96.322	11.458	Abe10*	Adaptabilidad	96		APQG01000007.1	
	102.999-106.433	3.434	Abe11	Adaptabilidad	99		APQG01000007.1	
	8.107-11.787	3.680	Abe2*	Adaptabilidad	94	507_ABAU	JVEK01000235.1	26
	23.104-36.960	13.856	Abe4*	Estabilidad y adaptabilidad	97		JVEK01000235.1	
	37.431-40.929	3.494	Abe5*	Adaptabilidad	86		JVEK01000265.1	
	51.114-56.121	5.007	Abe6*	Estabilidad y adaptabilidad	99		JVEK01000235.1	
	7.847-9.641	1.794	Abe2*	Adaptabilidad	99	KCTC 23199	BBLJ01000102.1	23.722
	36.962-50.325	13.363	Abe5	Adaptabilidad	99		BBLJ01000069.1	
	84.864-86.792	1.928	Abe10*	Adaptabilidad	99		BBLJ01000081.1	
	91.925-96.322	4.397	Abe10*	Adaptabilidad	96		BBLJ01000078.1	
	104.193-106.433	2.240	Abe11	Adaptabilidad	99		BBLJ01000078.1	
	34.737-36.634	1.897	Abe4*	Adaptabilidad	86	Ag2	LBNA01000036.1	5.430
	37.431-40.964	3.533	Abe5*	Adaptabilidad	86		LBNA01000006.1	
	2.176-6.882	4.706	Abe2	Adaptabilidad	97	WC-743	AMFQ01000126	4.706
	107-1.383	1.276	Abe1*	Replicación	81	507_ABAU	JVEK01000173.1	3.556
	1.900-2.204	304	Abe1*	Adaptabilidad	74		JVEK01000173.1	
	13.128-15.104	1.976	Abe1*	Transferencia	76		JVEK01000173.1	
	1.458-2.107	649	Abe1*	Adaptabilidad	71	CHI-40-1	CDEL01000197.1	2.571
	6.904-7.384	480	Abe2-3; Abe3*	Adaptabilidad	87		CDEL01000201.1	
	7.361- 8.047	686	Abe3*	Estabilidad	82		CDEL01000088.1	

Tabla III.2.8 (cont.)

	9.479-10.235	756	Abe3-4; Abe4	Desconocido	98		CDEL01000195.1	
	8.157-9.170	1.013	Abe3*	Adaptabilidad	78	CIP 70.12	APQG01000012.1	1.013
	8.157-9.171	1.013	Abe3*	Adaptabilidad	78	KCTC23199	BBLJ01000051.1	1.013
	3.760-4.445	685	Abe3*	Estabilidad	84	507_ABAU	JVEK01000068.1	2.652
	6.902-8.869	1.967	Abe6*	Transferencia	75		JVEK01000173.1	
	1.539-2.170	631	Abe1 *	Desconocido	77		CDEL01000197.1	
	3.713-4.504	791	Abe3*	Estabilidad	91	CHI-40-1	CDEL01000314.1	1.422
pAbe229-9	3.760-4.445	685	Abe3*	Estabilidad	84	WC-743	AMFQ01000013.1	685
	3.780-4.445	665	Abe3*	Estabilidad	84	NIPH3	APPK01000024.1	665
	1-315	315	Abe1*; Abe6*	Desconocido	71	CIP 70.12	APQG01000002.1	315
	1-315	315	Abe1*; Abe6*	Desconocido	71	KCTC23199	BBLJ01000084.1	315
pAbe229-4	31-2.383	2.352	Abe1; Abe1-2; Abe2; Abe2-3; Abe3	Estabilidad	90	Ag2	LBNA01000007.1	2.352
	248-692	444	Abe1 *	Desconocido	74	CHI-40-1	CDEL01000176.1	444

^aSe muestran valores con elevada similitud, al menos 70% de identidad de nucleotídica y cobertura de 1.000 pb (para el caso de pAbe229-114) o 300 pb (para pAbe229-15, pAbe229-9, pAbe229-4). Estos parámetros fueron elegidos arbitrariamente.

^bSegmentos ubicados entre dos regiones Abe son indicados mediante las regiones flanqueantes separadas por un guión (por ejemplo, Abe1-2 es el segmento entre Abe1 y Abe2). Las regiones Abe con asteriscos implican que la cobertura del "query" es parcial.

III.2.2.4.3.4.2.2.1. Análisis comparativos de pAbe229-114

El análisis comparativo de cada región descrita de pAbe229-114 (ítem III.2.2.4.3.4.1.1; regiones 1-12, Fig. III.2.11; Tabla III.2.5) se efectuó contra las secuencias nucleotídicas de los genomas de *A. bereziniae* depositados en base de datos (Tabla III.2.7).

La región de replicación *oriV-repB* no fue detectada en ninguno de los genomas de *A. bereziniae* (Fig. III.2.14.A) mostrando que este sistema de replicación es único de HPC229. Respecto a los segmentos asociados a funciones de estabilidad, el correspondiente a la GI1 que incluye los genes *hipA/hipB*, *fic/yhfG* de los sistemas TA se detectó en los genomas de NIPH3, CHI-40-1 y WC-743 mientras que en ABAU_507 solo los genes *fic/yhfG* se encuentran presentes (región parcial *Abe4*, Fig. III.2.14.A; Tabla III.2.8). La identificación de este segmento génico en varios genomas de *A. bereziniae*, propuesto aquí como isla genómica (ítem III.2.2.4.3.1.1), apoyaría la hipótesis de su transferencia horizontal entre cepas de la especie. A su vez, la región 12 (Fig. III.2.11) que contiene los genes *higB/higA* correspondientes a las funciones de estabilidad se encuentra presente en los genomas de las cepas CIP 70.12, KCTC 23199 y CHI-40-1 (región *Abe12*, Fig. III.2.14.A; Tabla III.2.8). Curiosamente, estos genes se hallan insertos en el contig0013 de esta última cepa, el cual también contiene el gen *mobA*, lo que sugiere que dicho contig corresponda a la secuencia nucleotídica parcial de un plásmido y refuerzan asimismo la hipótesis de que los sistemas TA son movilizados frecuentemente por plásmidos (Van Melderen y De Bast, 2009). Por último, los genes *higA2/higB2* del sistema TA (región 9, Fig. III.2.11), y los genes *parAB* del sistema de partición (región 1, Fig. III.2.11) no fueron detectados en ninguna de las cepas de *A. bereziniae* sugiriendo su adquisición en pAbe229-114 (Fig. III.2.14.A).

El módulo de conjugación incompleto presente en pAbe229-114 tampoco fue detectado en los genomas utilizados en este análisis comparativo (nt 98.590-103.001, Fig. III.2.14.A). Esta observación, sumada a la realizada en la comparación contra *Acinetobacter-no-bereziniae* refuerza la hipótesis de la adquisición de esta región a través de un evento de THG desde un miembro no-*Acinetobacter* (e.g. *P. stutzeri*), y coincide a su vez con la observación del alto contenido GC que exhibe esta región en coincidencia al contenido GC de *P. stutzeri* (ítem III.2.2.4.3.1.1).

En lo que concierne a la región de adaptabilidad, los genes que confieren resistencia a cadmio-cobalto-zinc (genes tipo-*cadA/cadR*) se encontraron en WC-743, CIP 70.12 y KCTC 23199 (región *Abe2*, Fig. III.2.14.A; Tabla III.2.8), mientras que aquellos genes que confieren

resistencia a níquel (*nrpA/nrpB*) se identificaron en 507_ABAU, NIPH3 y CHI-40-1 (región *Abe6*, Fig. III.2.14.A; Tabla III.2.8). Por otro lado, los genes que confieren resistencia contra estrés oxidativo *msrA*, *grxC*, *selR*, *msrA*-like (región *Abe5/Abe5-6*, Fig. III.2.14.A; Tabla III.2.8) y *gstA*, *msrA2* y *selR* (región *Abe10*, Fig. III.2.14.A; Tabla III.2.8) se detectaron en los genomas de las cepas CIP 70.12 y KCTC 23199. Además, las regiones *Abe7* y *Abe8* (Fig. III.2.14.A; Tabla III.2.8) que codifican para los genes que confieren resistencia a fagos, sistema BREX tipo 1, se encontraron en los genomas correspondientes de las cepas NIPH 3 y CHI-40-1. Por último, el fragmento que incluye el gen *gshR*, que está flanqueado por la *ISAbal2* y Δ *ISAbal22* (*Abe11*, Fig. III.2.14.A; Tabla III.2.8), se detectó en las cepas CIP 70.12 y KCTC 23199. Tomando el conjunto completo de genes o grupos de genes con funciones de adaptabilidad, este análisis refuerza la idea de que los plásmidos actúan como vehículos que facilitan la movilización de rasgos adaptativos entre diferentes cepas de la especie *A. bereziniae*.

En síntesis, estos resultados indican que numerosas regiones homólogas se encuentran en otras cepas de *A. bereziniae*, siendo en su mayoría aquellas que incluyen genes codificantes de funciones de adaptabilidad. Sin embargo, pAbe229-114 tiene un conjunto único de genes de replicación, partición y transferencia. Estas observaciones sugieren que los segmentos de adaptabilidad son particularmente movilizados entre diferentes replicones presentes en *A. bereziniae* mostrando así la importancia de dichas regiones en la adaptabilidad de la especie al ambiente.

III.2.2.4.3.4.2.2.2. Análisis comparativo de pAbe229-15 y pAbe229-9

Se procedió al análisis comparativo contra la base de datos de *A. bereziniae* de los plásmidos pAbe229-15 y pAbe229-9, tomando en consideración las regiones homólogas identificadas (regiones 1-5 y 1-6, respectivamente, Fig. III.2.12; Tabla III.2.5) cuando se efectuó la búsqueda de homologías contra bases de datos de *Acinetobacter* no-*bereziniae* (ítem III.2.2.4.3.4.1.3).

La búsqueda de homologías de las regiones contiguas de replicación y transferencia de pAbe229-15 (región 1, Fig III.2.12.A) contra la base de datos de *A. bereziniae* mostró que *oriV*, *repB*, y un segmento parcial de funciones de transferencia de pAbe229-15 mostraron identidades nucleotídicas del 81% y 76%, respectivamente, con regiones del contig 1343_5638_331075 del

genoma de la cepa 507_ABAU (región *Abe1*, Fig. III.2.14.B; Tabla III.2.8). Al analizar el contig mencionado se pudo comprobar la presencia de *repB* codificante de la replicasa RepB (WP_005804946.1) con dominio Rep-3 así como *mobA* cuyo producto proteico es una relaxasa MobA (WP_004698297.1) con dominio MobA/MobL. Teniendo en cuenta que la mayoría de los plásmidos reportados de *Acinetobacter* spp poseen replicasas con el dominio Rep-3 (Lean y Yeo, 2017), y que la relaxasa MobA es utilizada comúnmente como marcador filogenético para la clasificación de plásmidos (Francia et al., 2004; Garcillán-Barcia et al., 2011), es posible sugerir que la cepa 507_ABAU presenta un plásmido no ensamblado al presente. Los genes *higA2/higB2* asociados a funciones de estabilidad se identificaron solo en el genoma de CHI-40-1 (región *Abe3*, Fig. III.2.14.B; Tabla III.2.8). Los dos marcos de lectura abierto de desconocidas funciones y *cspE* (pfam00313), codificante de una proteína asociada a la respuesta por shock por frío vinculado a la región de adaptabilidad, se detectaron en CIP 70.12, KCTC 23199 (región *Abe3*, Fig. III.2.14.A; Tabla III.2.8). Ha sido interesante notar que el contig que contiene estos genes (contig201) también posee un gen cuyo producto proteico presenta dominio *mobA/mobL* (CEI53367.1) mostrando así que probablemente sea un contig plasmídico según lo sugerido para la clasificación de plásmidos conjugativos/movilizables (Francia et al., 2004; Garcillán-Barcia et al., 2011). Además, la región de adaptabilidad que incluye a los genes involucrados en la vía de degradación de la creatina (región 2, Fig. III.12.A), se detectó con 97% de identidad nucleotídica en la cepa WC-743 (región *Abe2*, Fig. III.2.14.B; Tabla III.2.8). Por su parte, la región *Abe3-4/Abe4*, que incluye un marco de lectura hipotético, mostró homología con el contig195 del genoma de la cepa CHI-40-1 (Fig. III.2.14.B; Tabla III.2.8) sugiriendo que la región que incluye a este gen de función desconocida estaría involucrada en eventos de THG. Ha sido interesante notar que este contig también codifica para una replicasa de la superfamilia Rep-3 (WP_002011663.1) indicando la presencia de un segmento de un plásmido aún no ensamblado en dicha cepa.

En síntesis, los análisis comparativos efectuados para pAbe229-15 mostraron que, con excepción de la región que abarca los nucleótidos 10,236-13,127, hay secuencias similares en otros genomas de cepas de *A. bereziniae* (Fig. III.2.14.B; Tabla III.2.8). Pudo observarse que comparte las funciones de transferencia y replicación con 507_ABAU (región *Abe5*, Fig. III.2.14.B), la vía de degradación de la creatina (región *Abe1*, Fig. III.2.14.B) con WC-743, y los

genes *higA2B2* con CHI-40 -1 (región Abe2, Fig. III.2.14.B). Es interesante observar que la región Abe3-4/Abe4 se encuentra flanqueada por sitios de recombinación sitio específica XerC/D₃ y 4 (Figs. III.2.12.A y III.2.14.B), y que toda esta región incluyendo los sitios muestran homología con un contig del genoma de CHI-40-1, el cual, como arriba se describió, contiene el gen codificante de una replicasa de la superfamilia Rep-3. Estos resultados muestran que dicho segmento puede ser movilizado intracelularmente por eventos de recombinación, y estaría sujeto a THG entre ambas cepas.

Análisis comparativos similares efectuados con pAbe229-9 contra la base de datos de *A. bereziniae* mostraron que el segmento *oriV-repB* de la región de replicación de pAbe229-9 (región 1, Fig. III.2.12.B) no se encuentra presente. No obstante, es importante aclarar que la identidad de esta región con los genomas de CHI-40-1 y WC-743 (región Abe1, Fig. III.2.14.C) es menor a 70% y por lo tanto no se consideran homólogas de acuerdo a los criterios establecidos (ítem III.2.2.4.3.4.2.2). La región de estabilidad que comprende a los genes *splA/splT* del sistema TA (región 3, Fig. III.2.12.B) muestra elevada identidad nucleotídica con secuencias presentes en las cepas CHI-40-1, WC-743, NIPH3 y 507_ABAU (región Abe3, Fig. III.2.14.C; Tabla III.2.8). Esta observación revela que el sistema SplAT se encuentra ampliamente diseminado en *A. bereziniae* ya que se encuentra en cinco de los ocho genomas en estudio. Como se expuso previamente (ítem III.2.2.4.3.4.1.4), esta región está flanqueada por los sitios XerC/D₆ y 7 y aunque no hay evidencias de coexistencia de ambos sitios en los restantes genomas de *A. bereziniae*, la presencia de iguales sitios en pAV1 de *A. venetianus* VE-C3 sugiere que los eventos de recombinación mediados por los sitios XerC/D mencionados estarían involucrados en la diseminación de estos genes. La región de transferencia (región 6, Fig. III.2.12.B) mostró homología solo con el contig 1343_5638_331075 del genoma de la cepa 507_ABAU (región Abe6, Fig. III.2.14.C; Tabla III.2.8). La región de transferencia incluida en este contig es similar a la identificada en los análisis comparativos para la región de transferencia del plásmido pAbe229-15 (región Abe1, Fig. III.2.14.B). Esta observación es debido a la homología entre las regiones de transferencia de pAbe229-15 y pAbe229-9 (ítem III.2.2.4.3.2). Por último, los genes *secC* y *ymdB* (Tabla A.5) correspondientes a las funciones de adaptabilidad (regiones 2 y 4, respectivamente, Fig. III.2.12.B) no fueron detectados en los genomas de *A. bereziniae* lo que

sugiere que este segmento ha sido adquirido por eventos de THG desde otras especies de *Acinetobacter* spp.

En conjunto, las observaciones anteriores muestran que las regiones descritas para los plásmidos pAbe229-15 y pAbe229-9 se encuentran escasamente representadas en la especie *A. bereziniae*. Estos resultados sugieren así que estos EGM constituirían estructuras quiméricas de segmentos génicos derivados de otras especies de *Acinetobacter*.

III.2.2.4.3.4.2.2.3. Análisis comparativo de pAbe229-4 y pAbe229-1

Se procedió al análisis comparativo contra *A. bereziniae* de las cuatro regiones descritas en los estudios comparativos contra *Acinetobacter* no-*bereziniae* de pAbe229-4, y de la secuencia nucleotídica completa en el caso de pAbe229-1 (regiones 1-4 y 1, respectivamente, Fig. III.2.13), empleando GCview.

En lo concerniente a pAbe229-4, el análisis comparativo de las regiones mostró un segmento homólogo de 2.352 pb que incluye dos marcos de lectura hipotéticos y los genes asociados a la región de estabilidad *relB/relE* del sistema TA, sólo en el genoma de la cepa Ag2 (regiones *Abe1/Abe1-2/Abe2/Abe2-3/Abe3*, Fig. III.2.14.D; Tabla III.2.8).

Finalmente, pAbe229-1 no presenta regiones homólogas en otros genomas de *A. bereziniae* mostrando así que es un plásmido único en esta especie.

Estos resultados muestran que las secuencias de los plásmidos más pequeños de HPC229 se hallan escasamente reportadas al presente en genomas depositados de la especie.

III.2.2.4.3.5. Clasificación de los plásmidos de HPC229 basada en la comparación de secuencias de sus replicasas y relaxasas

Los plásmidos son vehículos importantes para la diseminación de genes de resistencia entre patógenos nosocomiales incluyendo los miembros de *Acinetobacter* spp. (Bertini et al., 2010; Fondi et al., 2010; Garcillán-Barcia et al., 2011; Carattoli et al., 2013; Evans y Amyes, 2014; Lean y Yeo, 2017; Salto et al., 2018). En este contexto, su tipificación es una herramienta útil para estudiar la propagación y la evolución de éstos dentro de una población de especies bacterianas (Garcillán-Barcia et al., 2011; Carattoli et al., 2013). Los esquemas de tipificación basados en los módulos de replicación y/o movilidad son los más ampliamente usados para la

clasificación de plásmidos (Garcillán-Barcia et al., 2011). En este contexto, realizamos la caracterización de los plásmidos presentes en HPC229 basada en ambos esquemas.

III.2.2.4.3.5.1. Clasificación según sus replicasas

La replicación de los plásmidos como elementos autónomos implica un sistema de replicación funcional, en el cual la proteína RepB es quien permite el inicio del proceso de replicación. La caracterización de los plásmidos de HPC229 permitió inferir la existencia de tres replicasas de la superfamilia Rep-3 presentes en pAbe229-114, pAbe229-15 y pAbe229-9 (ítems III.2.2.4.3.1 y III.2.2.4.3.2). Para la clasificación de los plásmidos de la cepa local, se tomó en cuenta el esquema basado en la relación filogenética de las replicasas de miembros de *Acinetobacter* spp. que los agrupa en grupos de homología o AR3G (por “*Acinetobacter* Rep-3 Groups”), dado que las mismas presentan el dominio de la superfamilia Rep-3 (ítem II.7.9.1, Mats. y Méts.). Los grupos al presente descritos son 16, y se adoptó como punto de corte 60% de identidad aminoacídica (Salto et al., 2018). Así, la clasificación de los plásmidos pAbe229-114, pAbe229-15 y pAbe229-9 en base a sus replicasas se realizó a través de la comparación de sus secuencias aminoacídicas contra la base de datos de replicasas de *Acinetobacter* spp., recientemente reportada (Salto et al., 2018). Para ello, se construyó una base de datos de proteínas incluyendo las secuencias de las replicasas reportadas (Salto et al., 2018), y se asignó cada una de las replicasas de los plásmidos de HPC229 a los AR3G definidos, empleando la herramienta BlastP (ítem II.7.9.1, Mat. y Méts.).

Los resultados de este análisis mostraron que RepB de pAbe229-114 se agrupa en AR3G4 siendo 99% la identidad aminoacídica con la replicasa del plásmido pXBB1-8 (WP_004637173.1) perteneciente a la cepa *A. johnsonii* XBB1 (parte superior, Tabla III.2.9). En el caso de pAbe229-15, la replicasa mostró un valor de 100% de identidad aminoacídica con el homólogo de pMMD (YP_006961790.1) de la cepa clínica *A. baumannii*, perteneciente al grupo AR3G3 (parte superior, Tabla III.2.9). Por último, la replicasa de pAbe229-9 mostró un 85% de identidad aminoacídica con RepB de pAV1 correspondiente a la cepa ambiental de *A. venetianus* VE-C3 (YP_001661463.1, Tabla A.5) que pertenece a AR3G6 en la clasificación de Salto y cols. (Salto et al., 2018). Estos resultados muestran que homólogos de las replicasas de los plásmidos de HPC229 están distribuidos entre miembros de *Acinetobacter* spp. Asimismo, la observación de que las replicasas se encuentran tanto en cepas clínicas como ambientales revela el intercambio de módulos de replicación y/o plásmidos entre cepas de distintos nichos.

Tabla III.2.9. Clasificación de replicasas plasmídicas de *A. bereziniae* HPC229 (parte superior), y de restantes genomas de cepas de *A. bereziniae* (parte inferior, ver ítem III.2.2.4.3.5.3)

Plásmido	Número de acceso RepB	Superfamilia de la proteína Rep ^a	Identidad aminoacídica (%)	Número de acceso Rep	Plásmido portador de Rep	Origen del plásmido (Microorganismo)	Grupo ^a
pAbe229-114	RSZ23343.1	Rep-3	99.74	WP_004637173.1	pXBB1-8	<i>A. johnsonii</i>	AR3G4
			99.23	YP_009070446.1	pMS32-1	<i>A. pittii</i>	
					p3ABA YE	<i>A. baumannii</i>	
			99.23	WP_000064928.1	pXM2	<i>A. calcoaceticus</i>	
			98.72	YP_009070355.1	p6411-89.111	<i>A. nosocomialis</i>	
			98.72	WP_005155758.1	pM131-2	<i>Acinetobacter</i> sp.	
pAbe229-15	RSZ23269.1	Rep-3	98.72	WP_005155758.1	pAV3 ^b	<i>A. venetianus</i>	AR3GR3
			73.72	WP_000140303.1	pD36-4 ^b	<i>A. baumannii</i>	
			100.00	YP_006961790.1	pMMD	<i>A. baumannii</i>	
			100.00	YP_003293957.1	pMMCU2	<i>A. baumannii</i>	
			100.00	YP_003090213.1	pMMCU1	<i>A. calcoaceticus</i>	
			95.25	YP_001736296.1	pABIR	<i>A. baumannii</i>	
			89.19	CAP02944.1	p2ABSDF ^b	<i>A. baumannii</i>	
					pCMC8300 ^b	<i>A. baumannii</i>	
			86.78	WP_005804946.1	pABUH3b-7.8	<i>A. baumannii</i>	
					pABUH3a-8.2	<i>A. baumannii</i>	
pAbe229-9	RSZ23200	Rep-3	76.11	WP_000987942.1	pNaval17-13	<i>A. baumannii</i>	AR3G6
			76.45	WP_058952636.1	pNaval81-13	<i>A. baumannii</i>	
			75.43	CAP02992.1	pXBB1-3	<i>A. johnsonii</i>	
			85.16	YP_001661463.1	p3ABSDF ^b	<i>A. baumannii</i>	
			85.16	WP_006582659.1	pAV1	<i>A. venetianus</i>	
					pXBB1-5	<i>A. johnsonii</i>	
Cepas de <i>A. bereziniae</i>	Número de acceso de Rep	Superfamilia de la proteína Rep ^a	Identidad aminoacídica (%)	Número de acceso de Rep	Plásmido portador de Rep	Origen del plásmido (Microorganismo)	Grupo ^a
Ag2	WP_046759477.1	Rep-3	60.00	YP_009068008.1	pMS32-3	<i>A. pittii</i>	AR3G13
NIPH3	WP_002046604.1	Rep-3	100.00	WP_002046604.1	pAV3 ^b	<i>A. venetianus</i>	AR3G9
WC-743	WP_009586662.1	Rep-3	80.65	YP_009067182.1	pM131-8	<i>Acinetobacter</i> sp.	AR3G8
KCTC 23199	WP_010591570.1	pfam03090	-	-	-	-	-
CIP 70.12/	WP_000743064.1	RepC	100.00	WP_000743064.1	pAB3	<i>A. baumannii</i>	ARCG1 ^c
KCTC 23199	WP_004889343.1	Rep_3	78.62	WP_000786839.1	pD36-4 ^b	<i>A. baumannii</i>	AR3G9
507_ABAU	WP_005320426.1	Rep_3	66.80	WP_001205341.1	pXBB1-4	<i>A. johnsonii</i>	AR3G1.1
	WP_005804946.1	Rep_3	100.00	WP_005804946.1	pCMC8300 ^b	<i>A. baumannii</i>	AR3G3
					pABUH3b-7.8	<i>A. baumannii</i>	
					pABUH3a-8.2	<i>A. baumannii</i>	AR3G1.4
	WP_032049727.1	Rep_3	85.16	WP_002124966.1	II(CIP70.10)	<i>A. baumannii</i>	
CHI-40-1	WP_049044560.1	Rep_3	80.13	WP_049068997.1	II(R2091)	<i>A. baumannii</i>	AR3G15
	WP_002011663.1	Rep_3	97.78	WP_001208779.1	pXBB1-9	<i>A. johnsonii</i>	AR3G1.2
					pIS123-12	<i>A. baumannii</i>	
	WP_042090107.1	Rep_3	96.09	YP_001661474.1	pNaval81-26 ^b	<i>A. baumannii</i>	AR3G11
	WP_005021644.1	Rep_3	83.87	WP_002124966.1	pAV2	<i>A. venetianus</i>	
					II(CIP70.10)	<i>A. baumannii</i>	AR3G1.4
					II(R2091)	<i>A. baumannii</i>	
	WP_004856439.1	Rep_3	96.08	CAP02936.1	p1ABSDF	<i>A. baumannii</i>	AR3G5
	WP_004282236.1	Rep_3	100.00	WP_004282236.1	pABUH2b-5.4	<i>A. baumannii</i>	AR3G2
	WP_026441244.1	Rep_3	98.34	WP_050049564.1	p6411-66.409 ^b	<i>A. nosocomialis</i>	AR3G12
	WP_039048370.1	Rep_3	99.68	WP_002046604.1	pAV3 ^b	<i>A. venetianus</i>	AR3G9

^aSuperfamilia, y Grupo *Acinetobacter* Rep-3 según Salto y cols. (Salto et al., 2018).

^bPlásmidos codificantes de múltiples replicasas.

^cNueva clasificación propuesta en este trabajo.

III.2.2.4.3.5.2. Clasificación según sus relaxasas

El proceso de conjugación de plásmidos contribuye a la diseminación de genes que median la adaptación de la bacteria hospedadora a nichos ambientales diferentes (Francia et al., 2004). En este sentido, la caracterización de plásmidos transmisibles contribuye al conocimiento de la diseminación de genes y su evolución en comunidades bacterianas. Las relaxasas, proteínas presentes tanto en plásmidos conjugativos como así también en plásmidos movilizables, desempeñan un papel clave en la movilización de plásmidos y, por tanto, se propusieron para la clasificación de plásmidos transmisibles (Salto et al., 2018). La clasificación resulta del análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de los 300 AA del N-terminal de las relaxasas, y las agrupa en seis familias MOB (*i.e.* MOB_F, MOB_{HEN}, MOB_C, MOB_Q, MOB_P y MOB_V; Francia et al., 2004; Garcillán-Barcia et al., 2009). Se expuso previamente (ítem III.2.2.4.3.1) que pAbe229-114 posee la relaxasa TraI (pfam03432; Tabla A.3), mientras que, pNDM229, pAbe229-15 y pAbe229-9 poseen genes codificantes de relaxasas MobA (pfam03389; Tabla A.1, A.3 y A.4, respectivamente). La clasificación de las proteínas Rep presentes en los plásmidos de HPC229 se realizó de acuerdo al esquema propuesto (Salto et al., 2018). Para ello, se construyó una base de datos que incluyó las secuencias de las relaxasas descriptas por Salto y cols. (ítem II.7.9.2, Mats. y Méts.), y contiene así representantes de familias y subfamilias de todos los grupos MOB mencionados, como así también secuencias del subgrupo recientemente denominado como MOB_{Qaci}, integrado únicamente por relaxasas del género *Acinetobacter* (Salto et al., 2018). Se realizaron los alineamientos de los 300 AA del extremo N-terminal de las secuencias codificadas en los cuatro plásmidos de HPC229 así como de las relaxasas de la base de datos arriba mencionada, empleando ClustalW. Los resultados mostraron que la proteína con mayor similitud de secuencia con TraI de pAbe229-114 fue la homóloga del plásmido conjugativo pQKH54 de una bacteria no cultivable (Tabla A.3, Haines et al., 2006), la cual pertenece al grupo MOB_P, específicamente al clado MOB_{P111} (Tabla III.2.10). Por otro lado, tanto MobA de pAbe229-15 como de pAbe229-9, quienes exhiben 94% de identidad aminoacídica entre ellas, se agruparon en la subfamilia MOB_Q, específicamente en el clado MOB_{Q1} (Fig. III.2.15; Tabla III.2.10) de acuerdo a los máximos valores de alineamiento observados. Las proteínas MobA de pAbe229-15

y pAbe229-9 exhibieron la mayor identidad de secuencia con MobA del plásmido pMAC de la cepa clínica *A. baumannii* 19606 (80 y 79%, respectivamente). Por último, la relaxasa TraA del plásmido pNDM229 mostró 100% de identidad con TraA del plásmido pNDM-40-1, como resultado esperable dado que ambos plásmidos son tipo-pNDM-BJ01, y sólo un 34% con el homólogo del plásmido pPRO2 (NC_008608.1) de la bacteria *Pelobacter propionicus* DSM 2379, integrante del clado MOB_{Q1} (Fig. III.2.15; Tabla III.2.10).

La familia MOB_Q está compuesta por relaxasas de plásmidos conjugativos como movilizables (Francia et al., 2004). Además, se ha reportado que las relaxasas de esta familia están presentes en plásmidos chicos (<30 kpb) con algunas pocas excepciones (Garcillán-Barcia et al., 2011). Por otro lado, las relaxasas de la familia MOB_P se distribuyen en plásmidos de una amplia variedad de tamaños y además están ampliamente representadas en gammaproteobacterias, lo que sugiere una constitución genética versátil y exitosa (Garcillán-Barcia et al., 2011). Los resultados de este análisis mostraron que tres de las cuatro relaxasas se agrupan en la subfamilia MOB_{Q1} (Fig. III.2.15). MobA de pAbe229-15 y pAbe229-9 son relaxasas que permitirían la movilización de los plásmidos con ayuda de plásmidos “helpers”, por lo tanto estos plásmidos son movilizables. Notablemente, TraA de pNDM229 (44 kpb), correspondiente a MOB_Q, se encuentra en un plásmido mayor a 30 kpb, siendo así este plásmido una de las excepciones (Garcillán-Barcia et al., 2011). Además, a pesar de que pNDM229 se muestra no conjugativo, se ha reportado que los plásmidos tipo-pNDM-BJ01 son transferibles (Jones et al., 2015), por lo que la clasificación de las relaxasas de estos plásmidos refuerza la heterogeneidad de esta familia. Por último, es de destacar la presencia de la relaxasa TraI perteneciente a la familia MOB_P en la cepa local HPC229. Este hallazgo muestra que *A. bereziniae* puede albergar no solo relaxasas de la familia MOB_Q, sino relaxasas de otras familias tal como se sugiere para otros miembros de *Acinetobacter* spp. (Salto et al., 2018).

Tabla III.2.10. Relaxasas plasmídicas evaluadas en este trabajo

Micoorganismo	Origen de la relaxasa (plásmido; o cepa, nombre de contig) ^a	Número de acceso	Número de acceso de la proteína	Clasificación de la relaxasa ^b
<i>Escherichia coli</i>	pMG828-4	DQ995354.1	ABJ16463.1	
<i>Escherichia coli</i>	pIGJC156	EU090225.1	ABU79841.1	
<i>Pelobacter propionicus</i>	pPRO2	NC_008608.1	WP_011733934.1	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	pSCI01	NC_002056.1	NP_044284.1	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	pAB14	EF059914.1	ABN41468.1	
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	p11745	DQ176855.1	ABA71358	
<i>Neisseria meningitidis</i>	pAB6	AF126482.1	AAD31795.1	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	pSJ7.4	AY221996.1	AAO45530.1	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	pMAC	AY541809.1	AAT09659.1	
<i>Acinetobacter</i> sp.	pIH8	-	-	
<i>Acinetobacter</i> sp.	C230	-	-	
<i>Acinetobacter</i> sp.	C127	-	-	
<i>Acinetobacter venetianus</i>	pAV2	DQ278486.1	ABC47684.1	
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	pTcM1	EU421841.2	ACA00179.1	
<i>Escherichia coli</i>	RSF1010	X04830.1	CAA28520.1	MOB _{Q1}
<i>Dichelobacter nodosus</i>	pDN1	NC_002636.1	NP_073212.1	
<i>Pasteurella multocida</i>	pCCK381	NC_006994.1	YP_232869.1	
Bacteria no cultivable	pIE1115	NC_002524.1	NP_065281.1	
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	pMS260	AB109805.1	BAD07019.1	
Bacteria no cultivable	pIE1130	AJ271879	CAB75594.1	
<i>Pasteurella multocida</i>	pVM111	AJ514834.1	CAD55845.1	
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	pNDM229	NZ_KT072713.1	WP_004993230.1	
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	pAbe229-9	LKDJO2000000	WP_048765066.1	
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	pAbe229-15	LKDJO2000000	WP_012846858.1	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	pP	AY079199	AAL87010.1	
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	CHI-40-1, contig176	CDEL01000176	CEI52583.1	
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	pNDM-40-1	KF702385.1	AHF22521.1	
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	CHI-40-1, contig201	CDEL01000201	CEI53367.1	
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	507_ABAU, 1343_5638_331075	Z_JVEK0100017	WP_004698297	
<i>Rhizobium etli</i>	p42d	NC_004041	WP_011053391.1	MOB _{Q2}
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pTiC58	AF010180	AAC17212.1	
<i>Streptococcus</i> sp.	pIP501	L39769.1	AAA99466.1	MOB _{Q3}
<i>Lactobacillus salivarius</i>	pSF118-20	AF488831	AAQ06295.1	
<i>Acinetobacter</i> sp.	pIH6	-	-	
<i>Acinetobacter</i> sp.	pIH7	-	-	
<i>Acinetobacter</i> sp.	pIH16	-	-	
<i>Acinetobacter</i> sp.	C159	-	-	
<i>Acinetobacter</i> sp.	C161	-	-	
<i>Acinetobacter</i> sp.	C188	-	-	MOB _{QAc}
<i>Acinetobacter baumannii</i>	p1ABAYE	NC_010401	WP_005199240.1	
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	CHI-40-1, contig211	CDEL01000211	CEI53380.1	
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	CHI-40-1, contig143	CDEL01000143	CEI52088.1	
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	CHI-40-1, contig292	CDEL01000292	CEI54534.1	
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	WC-743, deg7180000004425	AMFQ01000130	ELW78751.1	

^aLos plásmidos indicados en negrita fueron secuenciados por Salto y cols. (Salto et al., 2018).

^bLa clasificación se basa en el análisis filogenético de la secuencia de los últimos 300 AA del extremo N-terminal de las relaxasas (Fig. III.2.15).

III.2.2.4.3.5.3. Clasificación de replicasas y relaxasas en la especie *A. bereziniae*

Los análisis comparativos mostrados revelaron que numerosas regiones de los plásmidos de HPC229 se encuentran en los genomas de *A. bereziniae* (ítem III.2.2.4.3.4.2.2). Además, se pudo observar que algunos contigs que contienen segmentos homólogos a los presentes en plásmidos de la cepa en estudio revelan la presencia de genes codificantes de proteínas usualmente detectadas en plásmidos, y/o empleadas como marcadores plasmídicos incluyendo *rep* (Lean y Yeo, 2017), *mob* (Francia et al., 2004), así como los sistemas TA (Chan et al., 2016). Estos resultados aportan evidencias indirectas de la presencia de plásmidos en los genomas de *A. bereziniae* que no fueron ensamblados. En este contexto, la búsqueda de marcadores plasmídicos en los genomas de todas las cepas de la especie, con excepción de XH901 que no presenta plásmidos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/12597?>) proveerá conocimiento sobre la diversidad de plásmidos de *A. bereziniae*, y finalmente sobre el plasmidoma del género *Acinetobacter*. Para ello, se buscaron replicasas y relaxasas en todos los genomas de esta especie, y se clasificaron de acuerdo a esquemas sugeridos (Salto et al., 2018).

La clasificación de las replicasas involucró la búsqueda de estas proteínas en los genomas de *A. bereziniae* disponibles en bases de datos (GenBank) del NCBI. Para ello, se construyó una lista de 22 replicasas putativas que fueron detectadas por búsqueda de palabras clave (“replicase”, o “replication”, o “*repA*” o “*repB*”) en los genomas anotados a través del sistema de anotación del NCBI (Tabla III.2.7), y posteriormente se utilizaron como “query” para comprobar la presencia de dominios replicasa empleando BlastP y Pfam. Es importante aclarar que las replicasas cromosómicas (DnaA; pfam00308) se excluyeron de esta búsqueda. Por último, las secuencias confirmadas se alinearon con homólogos de la base de datos arriba descrita (ítem III.2.2.4.3.5.1; valor de corte del 60%), asignándolas luego al grupo AR3G correspondiente (Salto et al., 2018). De esta manera, se pudieron identificar 17 replicasas en los genomas de *A. bereziniae* y las 5 secuencias restantes no presentaron dominios de replicasas siendo excluidas de este análisis. Entre las 17 replicasas identificadas, 16 contienen el dominio de la superfamilia Rep-3, mientras que la restante, correspondiente a *A. bereziniae* KCTC 23199 (WP_010591570.1) no presenta homología con la base de datos empleada sugiriendo que

pertenece a otra superfamilia (parte inferior, Tabla III.2.9). El análisis de esta última por Pfam mostró que contiene los dominios replicasa (pfam03090), primasa C (pfam08708), y “*helix-turn-helix* 28” (pfam13518). Un análisis comparativo adicional de esta proteína contra la base de datos del NCBI (GenBank) empleando BlastP indicó que hay homólogos de esta proteína en todo el género *Acinetobacter* (dato no mostrado). Sin embargo, la carencia de información respecto a esta proteína impide conocer si está involucrada en la iniciación de la replicación plasmídica. Por su parte, las 16 Rep arriba mencionadas agrupan en 11 de los 15 grupos AR3G definidos por Salto y cols. (Salto et al., 2018), e incluyen a miembros de los grupos AR3G1, conformado por los subgrupos AR3G1.1, AR3G1.2 y AR3G1.4, y los grupos AR3G2, AR3G3, AR3G5, AR3G8, AR3G9, AR3G11, AR3G12, AR3G13, AR3G14 y AR3G15 (parte inferior, Tabla III.2.9). Al analizar el número de replicasas codificadas por cada cepa, observamos que CHI-40-1 contiene 7 RepB pertenecientes a diferentes grupos AR3G (parte inferior, Tabla III.2.9), lo que sugiere que esta cepa contiene numerosos plásmidos, en línea con observaciones anteriores (Jones et al., 2015). Por otro lado, se identificaron 4 Rep en 507_ABAU, 2 en CIP 70.12 y KCTC 23199, y 1 en WC-743, NIPH3 y Ag2 (parte inferior, Tabla III.2.9). Cabe destacar que las cepas de *A. bereziniae* CIP 70.12 y KCTC 23199 codifican una replicasa idéntica (WP_000743064.1) a la encontrada en pAB3 de *A. baumannii* ATCC 17978 que se asignó al AR3G14 (Salto et al., 2018). Dado que estas 3 secuencias aminoacídicas, de *A. bereziniae* CIP 70.12, KCTC 23199 y *A. baumannii* ATCC 17978, contienen un dominio RepC (pfam06504) en reemplazo de un dominio Rep-3, se propuso aquí su asignación a un nuevo grupo, denominado ARCG1 (parte inferior, Tabla III.2.9). Las proteínas de la familia RepC se encuentran en plásmidos del grupo de incompatibilidad IncQ (Gardner et al., 2001), y funcionan como activadores de la replicación por unión a los iterones del *oriV* (Meyer, 2009). En síntesis, el conjunto de resultados sugiere que las cepas de *A. bereziniae* son capaces de albergar una diversidad de plásmidos que resulta de la observación de los diferentes grupos AR3 de la superfamilia Rep-3, como así también de la familia RepC; y que los mismos se diseminan entre distintos miembros del género *Acinetobacter*, según los homólogos observados (parte inferior, Tabla III.2.9).

Por otro lado, se analizaron las relaxasas putativas codificadas en los genomas de *A. bereziniae* de una manera similar a lo expuesto para las replicasas. Se realizaron búsquedas de estas proteínas en cada genoma según la anotación del NCBI y se construyó una lista de relaxasas putativas. Los candidatos seleccionados se utilizaron como *query* para comprobar que contengan dominios relaxasas (BlastP y Pfam). Por último, las secuencias confirmadas se alinearon con los homólogos de la base de datos de relaxasas previamente descripta (ítem III.2.2.4.3.5.2), y luego se construyeron árboles filogenéticos utilizando MEGA6 (ítem II.7.9.2, Mat. y Méts.) para asignar cada proteína a subgrupos MOB (Salto et al., 2018). Así, se identificaron en total 8 proteínas anotadas como relaxasas en los genomas de *A. bereziniae*. Entre ellas, 6 corresponden a la cepa CHI-40-1 siendo una de ellas TraA, contenida en el plásmido pNDM-40-1 (AHF22521.1, Tabla III.2.10; Jones et al, 2015), y las 2 restantes pertenecen a las cepas 507_ABAU y WC-743 (Tabla III.2.10). Como resultado del análisis filogenético (Fig. III.2.15; Tabla III.2.10), se observa que 4 de estas 8 proteínas agrupan en el subgrupo MOB_{Q1} incluyendo a 3 relaxasas de CHI-40-1 y la única presente en 507_ABAU, conjuntamente con las 3 relaxasas de HPC229 correspondientes a pNDM229, pAbe229-9, y pAbe229-15. Por su parte, las 4 restantes, 3 de CHI-40-1 y la correspondiente a WC-743, se agrupan en el subgrupo Mob_{QAc1} (Fig. III.2.15; Tabla III.2.10), recientemente descrito (Salto et al., 2018). Es interesante notar que de todas las relaxasas presentes en *A. bereziniae*, solo TraI correspondiente a pAbe229-114 de la cepa local se agrupa en una familia distinta a MOB_Q, y no fue incorporada en este análisis filogenético dado que ha sido restringido a miembros de MOB_Q. Por último, es de destacar que las cepas portadoras de *bla*_{NDM-1}, HPC229 y CHI-40-1, contienen elevado número de relaxasas, 4 en cada caso, mientras que algunas cepas de *A. bereziniae* como NIPH3, CIP 70.12, KCTC 23199 y Ag2 no mostraron evidencia de esta proteína, lo cual sugiere ausencia de plásmidos.

Podemos hipotetizar entonces que el amplio repertorio de funciones de replicación y movilización refleja la diversidad de plásmidos que se encuentra en las cepas clínicas resistentes a los carbapenemes, CHI-40-1 y HPC229, sugiriendo la influencia de la presión de selección antimicrobiana en la adquisición de EGM.

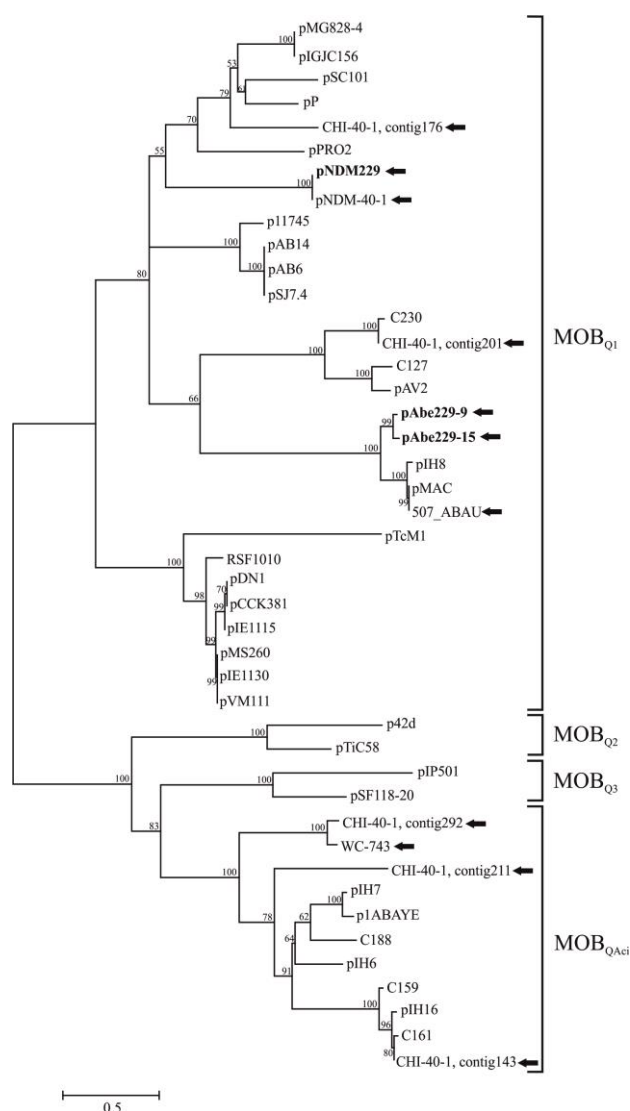


Figura III.2.15. Análisis filogenético de relaxasas plasmídicas pertenecientes a la familia MOB_Q. Se muestra el árbol obtenido empleando los 300 AA del extremo N-terminal de relaxasas de *A. bereziniae* HPC229 y de numerosas especies de bases de datos (Garcillán-Barcia et al., 2011; Salto et al., 2018), empleando ML. Se muestran las subfamilias MOB_{Q1}, MOB_{Q2}, MOB_{Q3} y MOB_{QAci}. Las relaxasas de los genomas de *A. bereziniae* se indican con flechas negras, y aquellas correspondientes a los plásmidos de *A. bereziniae* HPC229 se indican en negrita. Contigs de CHI-40-1 que contienen relaxasas, luego de la coma.

III.2.2.4.3.6. Identificación de sitios XerC/D en genomas de *A. bereziniae*

Estudios recientes sugieren que los sitios XerC/D se encuentran localizados principalmente en plásmidos flanqueando genes con características adaptativas (Blackwell y Hall, 2017, Cameranesi. et al., 2018, Mindlin et al., 2018), siendo así de interés la localización de estos sitios como herramienta para evaluar la evolución de las plataformas responsables de la diseminación de marcadores de resistencia (Cameranesi et al., 2018) u otros genes adaptativos. En los plásmidos de la cepa local HPC229 se identificaron 12 sitios XerC/D putativamente reconocidos por recombinasas XerC y XerD (ítem III.2.2.4.3.4.1.4). En este contexto, se investigó la presencia de dichos sitios en las secuencias genómicas de los 8 genomas de *A.*

bereziniae, con excepción de HPC229, dado que los sitios fueron ya descriptos, bajo el objetivo de dilucidar la prevalencia de los mismos, y evaluarlos como marcadores plasmídicos. Es esperable encontrar al menos el sitio XerC/D (*dif*) involucrado en la segregación cromosomal (Midonet y Barre, 2014), por lo que planteamos como hipótesis que sitios adicionales, o sea la presencia de más de uno, indicaría la presencia de plásmidos. Para este fin, los sitios XerC/D en los genomas de *A. bereziniae* se investigaron empleando como patrón el sitio consenso, con 6 pb en cr (Tabla III.2.6), construido para la cepa HPC229 aunque con una modificación en el cr (ítem II.7.7, Mat. y Méts). Dada la falta de conservación en la región central (Cameranesi et al., 2018), se decidió usar una secuencia completamente degenerada en esta parte de la secuencia consenso. De esta manera se utilizó un consenso diferente del obtenido de la cepa HPC229 (ítem III.2.2.4.3.4.1.4) para permitir encontrar sitios XerC/D que contengan un cr con cualquier nucleótido a los detectados en la cepa local. Es importante aclarar que los cr que poseen 5 y 7 pb son poco usuales, y no han sido incluidos en la búsqueda. Como resultado de la búsqueda, se identificaron un total de 55 sitios XerC/D putativos en los genomas correspondientes a las 8 cepas de *A. bereziniae* en estudio (Tabla III.2.11) Se identificaron 31 sitios en CHI-40-1, 7 en 507_ABAU, 5 en Ag2, 4 en WC-743, 3 en KCTC 23199, y 2 en las cepas CIP 70.12 y NIPH3 y 1 en XH901 (Tabla III.2.11). En esta última cepa que carece de plásmido, se identificó solo el sitio *dif* del cromosoma, coincidente con nuestra hipótesis. Es de destacar que las cepas clínicas portadoras de *bla*_{N_{DM}-1}, CHI-40-1 y HPC229, son las cepas que contienen mayor número de sitios. Estos resultados, en congruencia con las observaciones anteriores, indican que estas dos cepas contienen numerosos plásmidos y podrían indicar una correlación entre las cepas adaptadas al entorno hospitalario, y la presencia de sitios XerC/D en las secuencias nucleotídicas de las mismas.

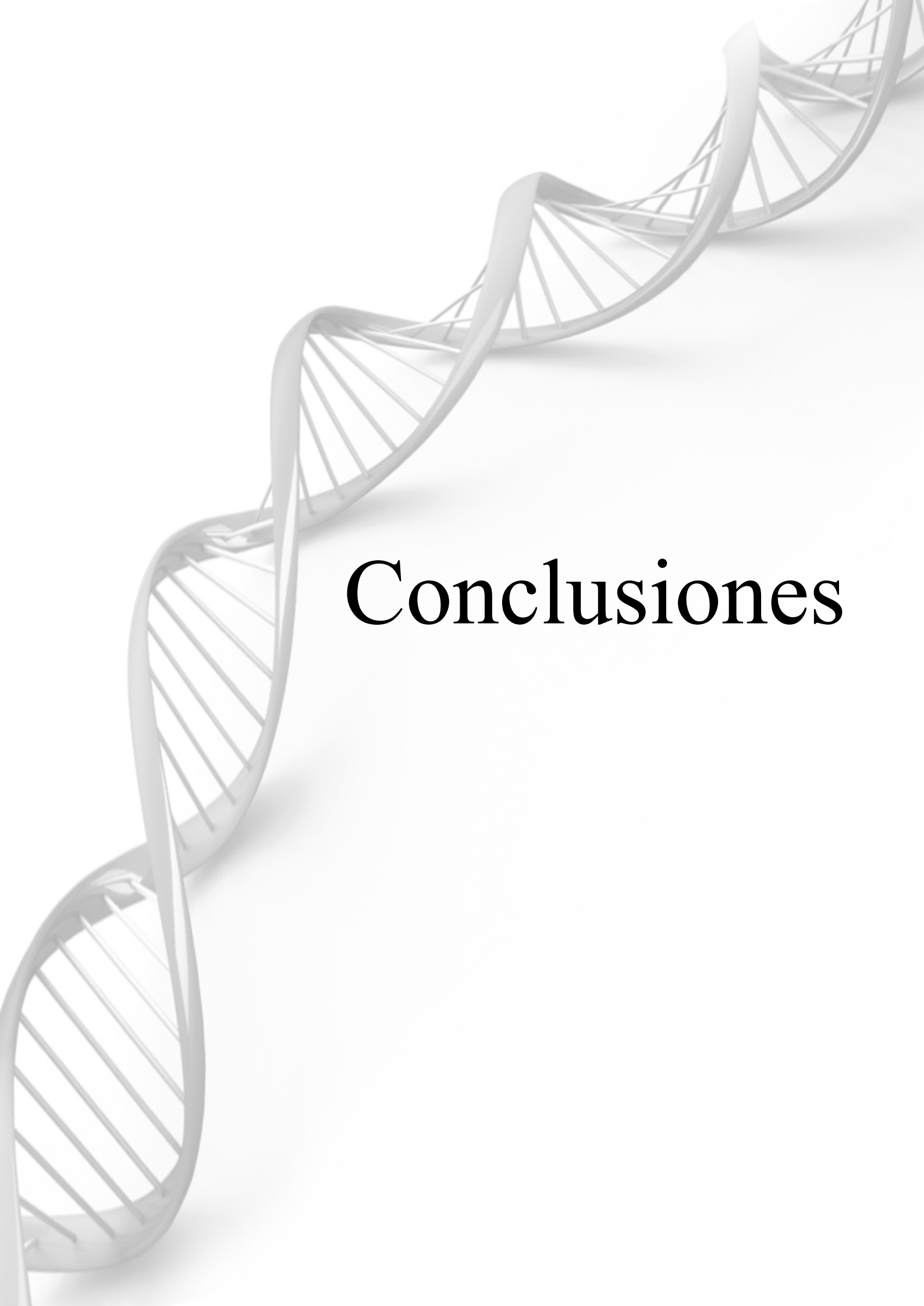
Así, se construyó una nueva secuencia consenso que incluye los 67 sitios de *A. bereziniae* (5'-atttCgcATAAggggtaTTATGTTAAaT-3', Tabla III.2.11), que resultó ser similar a la reportada para *A. baumannii* Ab242 (Cameranesi et al., 2018). Sin embargo, el análisis comparativo de las secuencias consenso de *A. bereziniae* y *A. baumannii* Ab242 mostró falta de conservación en uno de los nucleótidos del sitio XerC así como en uno de los nucleótidos del cr (Tablas I.12 y III.2.11). La similitud entre ambos consensos sugiere que los módulos flanqueados por XerC/D puedan ser intercambiados entre plásmidos de diferentes especies, según lo que surge de las secuencias consenso observadas para *A. baumannii* y *A. bereziniae*, y permite hipotetizar que el intercambio de secuencias genéticas entre miembros del género *Acinetobacter* mediado por recombinación sitio-específica sería un evento probable. Evidencias de esto último han sido detalladas previamente, dado que varios módulos de los plásmidos de HPC229 han sido identificados en otras especies (Tabla III.2.11).

Tabla III.2.11. Sitios XerC/D con cr6 identificados en los genomas de *A. bereziniae*

Cepa	Número de acceso	Inicio	Final	Hebra de ADN	Secuencia (5'→3') ^a	Sitios XerC/D con cr6 ^b
XH901	NZ_CP018259.1	2.252.203	2.252.230	+	ATTTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT	1
CIP 70.12	NZ_KB849756.1	2.472.881	2.472.908	+	ACTTCGTATAAGAGATTTTATGTTAAAT	2
	NZ_KB849756.1	2.475.090	2.475.117	+	ATTTTCGTATAAGGCGTATTATGTTAAAT	
NIPH 3	NZ_KB849462.1	87.353	87.380	+	ATTTTCGTATAACGTGTATTATGTTAAAT	2
	NZ_KB849468.1	404.186	404.213	-	ATTTTCGTATAATATATATTATGTTAAAT	
KCTC 23199	NZ_BBLJ01000039.1	16	43	+	ATTTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT	3
	NZ_BBLJ01000015.1	15	42	+	ATTTTCGTATAAGGCGTATTATGTTAAAT	
	NZ_BBLJ01000015.1	2.224	2.251	-	ACTTCGTATAAGAGATTTTATGTTAAAT	
WC-743	NZ_AMFQ01000112.1	6.049	6.076	+	ATTTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT	4
	NZ_AMFQ01000126.1	4.898	4.925	-	ATTTTCGTATAAGAGTTTTTATGTTAAAT	
	NZ_AMFQ01000149.1	35.473	35.500	-	ATTTTCGTATAAGGTGTATTATGTTAAAT	
Ag2		2.435	2.462	+	ATTTTCGCATAATAGTCATTATGTTAAAT	5
	NZ_LBNA01000011.1	7.784	7.811	+	ATTTTCGTATAAGCTGTATTATGTTAAAT	
		1.458	1.485	-	TTTTCTCATAAGAGATTTTATGTTAAAT	
	NZ_LBNA01000051.1	162.725	162.752	-	ATTTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT	
	NZ_LBNA01000007.1	4.058	4.085	+	ATTTTCGCATAACGTGCATTATGTTAAAT	
507_ABAU	NZ_VEK01000173.1	5.607	5.634	+	ATTTTCGTATAAGGTGTATTATGTTAAAT	7
		5	32	-	ATTTTCGCATAAGGTGTATTATGTTAAAT	
	NZ_JVEK01000215.1	5.884	5.911	+	ATTTTCGCATAATAGTCATTATGTTAAAT	
	NZ_VEK01000233.1	4.866	4.893	-	GTTTCGCATAACGCCCATTTATGTTAAAT	
	NZ_VEK01000235.1	32.348	32.375	-	ACTTCGTATAACGCCCATTTATGTTAAAT	
	NZ_JVEK01000110.1	13.509	13.536	+	ATTTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT	
CHI-40-1	NZ_VEK01000001.1	1.785	1.812	+	GATTTCGTATAAGAGATTTTATGTTAAAT	31
	NZ_CDEL01000010.1	30	57	+	GTTTCGCATAACGCCCATTTATGTTAAAT	
		540	567	-	ATTTTCGCATAAGGCGTATTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000075.1	6	33	-	ATTTTCGCATAAGGCGTATTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000083.1	443	470	-	ATTTTCGTATAACGCCCATTTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000088.1	1	28	-	GTTTCGCATAACAGCCATTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000089.1	1.207	1.234	-	ATTTTCGCATAAGAGATTTTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000107.1	48	75	-	ATTTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT	
		897	924	+	ATTTCTCATAAGCGCCATTATGTTAAAT	
		4.887	4.914	+	ACTTCGTATAAGAGTTTTTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000143.1	47	74	-	ATTTTCGCATAACGCCCATTTATGTTAAAT	
		1.457	1.484	-	GATTTCGCATAAGGCGTATTATGTTAAAT	
		3.981	4.008	-	GTTTCGCATAAGCGCTATTATGTTAAAT	
		1.945	1.972	+	ATTTTCGTATAAGGCGTATTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000195.1	3.573	3.600	+	ACTTCTCATAAGACGTATTATGTTAAAT	
		2.846	2.873	+	ACTTCTCATAAGCACCATTATGTTAAAT	
		4.334	4.361	-	GTTTCGCATAACAGCCATTATGTTAAAT	
CHI-40-1		1.205	1.232	+	AATTTCGCATAAGAGATTTTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000201.1	1	28	-	GTTTCGCATAACGCCCATTTATGTTAAAT	
		1.934	1.961	-	GCTTCGCATAAGCTGTATTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000211.1	103	130	+	AATTTCGTATAACGTGTATTATGTTAAAT	
		30	57	+	GTTTCGCATAACGCCCATTTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000236.1	661	688	-	ATTTTCGCATAAGGCGTATTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000266.1	1.920	1.947	+	ATTTTCGTATAAGGCGTATTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000292.1	1.963	1.990	+	ATTTTCGTATAACAACCATTTATGTTAAAT	
		1.361	1.388	+	ATTTTCGTATAAGGTGTATTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000305.1	1.759	1.786	-	ACTTCGCATAACAACCATTTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000312.1	2.079	2.106	+	ATTTTCGTATAAGGTGTATTATGTTAAAT	
		884	911	+	ACTTCGCATAACGCCCATTTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000314.1	3.592	3.619	+	ATTTTCGTATAAGGTGTATTATGTTAAAT	
CHI-40-1		1.526	1.553	-	ATTTTCGTATAACGCCCATTTATGTTAAAT	
	NZ_CDEL01000321.1	3.043	3.070	-	ATTTTCGTATAAGGTGTATTATGTTAAAT	



^aLa secuencia consenso inicial usada para identificar sitios XerC/D en genomas de *A. bereziniae* fue 5'-DHWYCKHATAANNNNNTTATGTTAADT-3'; siendo D=A/G/T, H=A/C/T, Y=C/T, K=G/T, W=A/T, N=A/T/C/G (ver texto). Fila inferior, secuencia consenso que surge del análisis del total de sitios XerC/D hallados en genomas de *A. bereziniae*, incluyendo HPC229. Esta secuencia 5'-atttCgcATAAggggtaTTATGTTAAaT-3' muestra los nt conservados en mayúscula. Los sitios XerC/D encontrados en los plásmidos de HPC229 han sido incluidos.



Conclusiones

IV. Conclusiones

Se detallan a continuación las conclusiones derivadas de este Trabajo de Tesis:

III.1. Capítulo 1

En este capítulo se abordó la caracterización de las plataformas involucradas en la diseminación de *bla*_{VIM-2}, una de las MβLs más diseminadas en Argentina y el mundo asociada principalmente a *P. aeruginosa*. Para ello, se seleccionaron como modelo de estudio aislamientos de *Pseudomonas* spp. de diferentes hospitales de Rosario y alrededores, y Buenos Aires. Este análisis contribuyó a una mayor comprensión de los EGM involucrados en la adquisición y diseminación de la resistencia a carbapenemes, aportando evidencias del rol de *P. grupo putida* como reservorio de genes de resistencia. Específicamente:

➤ La caracterización taxonómica de 13 aislamientos clínicos de *P. putida*, identificados inicialmente por VITEK-2, basada en el análisis de los concatenados de las secuencias parciales de ARNr 16S, *gyrB* y *rpoD*, permitió distinguir una variabilidad de especies. Este análisis identificó al menos 7 especies de *P. grupo putida*, incluyendo *P. putida* (#BA9115 y BA7908); *P. monteilii* (#HB157 y BA9713); *P. grupo putida/II* (#LA1008 y HE1012); *P. grupo putida/IV* (#LD209, HP613, HB313 y BA7816); *P. grupo putida/I* (#HP813); *P. grupo putida/V* (#BA9605); y una nueva especie asignada aquí como *P. grupo putida/VII* (#LA111). La determinación bacteriana mediante MALDI-TOF MS mostró confiabilidad solo para BA7908 y BA9115, siendo el resto de los aislamientos clasificados solo a nivel de género como miembros de *Pseudomonas* spp. Así, la comparación de los resultados entre ambos métodos confirma la necesidad de actualización de la base de datos del MALDI-TOF para este grupo bacteriano.

➤ Los análisis de identidad clonal de aislamientos clínicos de la misma especie, efectuados mediante OD-PCR, mostraron que *P. putida* BA9115 y BA7908 corresponden a diferentes clones, Pp_A y Pp_B, respectivamente. Similar resultado se observó para *P. monteilii* HB157 y BA9713, clones Pm_A y Pm_B, respectivamente; y *P. grupo putida/II* HE1012 y LA1008, clones PpGII_A y PpGII_B, respectivamente. Por su parte, los 4 aislamientos clínicos de *P. grupo putida/IV* constituyen dos clones, PpGIV_A (#BA7816) y PpGIV_{4B} (#LD209, HB313 y HP613). La metodología permitió así distinguir clones diferentes dentro de cada especie de *P. grupo putida* evidenciando diversidad genética en la colección de aislamientos bajo estudio.

➤ El análisis de las estructuras genéticas portadoras de *bla*_{VIM-2} en 12 de los aislamientos en estudio mostraron dos integrones/transposones tipo-Tn402 con su maquinaria de transposición completa, que incluye módulo *tni* e IRs flanqueantes. Ambos transposones son estrechamente

relacionados entre sí, siendo designados y depositados como Tn6335 y Tn6336. El primero de ellos fue hallado en 10 aislamientos de 7 especies diferentes de *P. grupo putida* incluyendo *P. putida*, *P. monteilii*, *P. grupo putida/I*, *P. grupo putida/II*, *P. grupo putida/IV*, *P. grupo putida/V* y *P. grupo putida/VII*; así como en *P. aeruginosa* HV868; y el segundo hallado en 2 aislamientos de las especies *P. putida* y *P. grupo putida/IV*. La estructura genética del Tn6335 incluye al integrón In41, el cual posee en su región variable *blav_{VIM-2}-aacA4*. Por su parte, Tn6336 incluyó al In899, cuya región variable contiene solo *blav_{VIM-2}*. Estos resultados evidencian la prevalencia de transposones relacionados y activos en numerosas especies de *P. grupo putida*, y agregan evidencia que permite considerar a este grupo bacteriano un reservorio de genes de resistencia.

➤ La caracterización de la plataforma portadora de *blav_{VIM-2}* en *P. monteilii* HB157 mostró un transposón tipo-Tn402 incompleto que incluye la estructura IRi-intII-dhfrB-aacA4-*blav_{VIM-2}-tniC*-IS6100. La detección del resto de los genes del módulo *tni* (*tniQ*-*tniB*-*tniA*-IRt) con identidades nucleotídicas inferiores al 85% respecto a sus homólogos del Tn402 permitió hipotetizar la presencia de dos transposones tipo-Tn402.

➤ La búsqueda sistemática de transposones tipo-Tn402 con maquinaria de transposición completa en *Pseudomonas* spp. mediante herramientas bioinformáticas mostró la presencia de dichas estructuras prevalentemente en cepas de *P. aeruginosa*. El hallazgo y caracterización de los EG hallados, derivados de transposones tipo-Tn402, en diferentes especies de *P. grupo putida*, aportan así datos relevantes de EG que se diseminan entre especies de este grupo.

➤ La caracterización de plásmidos portadores de *blav_{VIM-2}* recuperados de diferentes especies de *P. grupo putida*, empleando ensayos de restricción y secuenciación nucleotídica en algunos casos, reveló una arquitectura similar para los plásmidos conjugativos aquí caracterizados, derivados de *P. grupo putida/II* HE1012 (pHE1012); *P. grupo putida/IV* HB313 (pHB313) y BA7816 (pBA7816); y *P. grupo putida/V* BA9605 (pBA9605), así como para plásmidos controles derivados de *P. grupo putida/IV* LD209, y de *P. grupo putida/VII* (pLD209 y pLA111, respectivamente). Estos resultados permitieron denominar al conjunto de estos elementos plásmidos tipo-pLD209. Es interesante notar la diseminación de los mismos por eventos de THG intra-específico según el hallazgo de plásmidos tipo-pLD209 para clones pertenecientes a *P. grupo putida/IV* (e.g. LD209, HB313 y BA7816); así como la dispersión de estos plásmidos entre diferentes especies, según su hallazgo en *P. grupo putida/II*, *P. grupo putida/V*, y *P. grupo putida/VII*. Por último, la recuperación de los plásmidos tipo-pLD209 en *E. coli* DH5α empleada en ensayos de transformación revela su amplio rango de hospedador, y sugiere la potencial

diseminación de *bla*_{VIM-2} a patógenos de relevancia clínica (como enterobacterias), mediada por plásmidos de esta naturaleza.

➤ La localización genómica de las plataformas portadoras de *bla*_{VIM-2} evaluada mediante ensayos de transferencia de ADN, digestiones con S1 o *Xba*I/PFGE y ensayos de hibridación permitieron confirmar la portación de *bla*_{VIM-2} en plásmidos tipo-pLD209 en las cepas *P. grupo putida*/II HE1012, *P. grupo putida*/IV HB313, BA7816 y LD209, *P. grupo putida*/V BA9605, y *P. grupo putida*/VII LA111, como así también en un plásmido de elevado peso molecular en *P. aeruginosa* HV868. En contraposición, los resultados obtenidos para *P. putida* BA9115 y BA7908, *P. monteilii* HB157 y BA9713, *P. grupo putida*/I HP813, *P. grupo putida*/II LA1008 y *P. grupo putida*/IV HP613 evidencian la portación cromosomal de *bla*_{VIM-2}. El conjunto de resultados muestra la dispersión de plásmidos tipo-pLD209 entre especies de *P. grupo putida*, y entre éstas con *P. aeruginosa*; así como la funcionalidad de los transposones completos caracterizados, según los hallazgos de los mismos en plásmido (en algunas cepas) como en cromosoma (en otras cepas). Clones diferentes de la misma especie que muestran dichos transposones en plásmido o en cromosoma, respectivamente, aportan evidencias de esta movilización. Este análisis revela la prevalencia de estos EG en diferentes regiones de nuestro país, y confirma la importancia de conocer la epidemiología local asociada a la diseminación del gen *bla*_{VIM-2}, ligada no sólo a cepas epidémicas, sino a la transferencia de EG prevalentes.

➤ La evaluación de los sitios de inserción del Tn6335 en cromosoma de las cepas *P. grupo putida*/IV HP613 y *P. grupo putida*/II LA1008 revelaron que el mismo se encuentra interrumpiendo el sitio *res* de transposones tipo-Tn501 y tipo-Tn1403, respectivamente. Estas evidencias mostraron que la movilización de *bla*_{VIM-2} en la naturaleza está mediada por el elemento bordeado por las IRs correspondientes al Tn6335, y no a la estructura bordeada por las IRs del transposón de la familia Tn3 en el cual el Tn6335 se halla inserto (Tn9498). Así, los resultados obtenidos agregan evidencia de que los sitios *res* de transposones tipo-Tn3 son los lugares de elección para la inserción del Tn6335.

Así, los resultados revelaron que la diseminación de *bla*_{VIM-2} mediante los plásmidos tipo-pLD209 es el principal evento de transferencia inter-específica en las cepas de este estudio. A su vez, el reporte en Argentina de cepas de *P. aeruginosa* y *S. marcescens* portadoras de *bla*_{VIM-2} en el plásmido pDCPR1 (tipo-pLD209) agrega evidencias de diseminación inter-específica de los plásmidos tipo-pLD209 a patógenos de mayor relevancia clínica. Por otro lado, el hallazgo de Tn6335 y Tn6336 en cromosoma en cepas de la colección local aporta evidencias de eventos de transposición intra-específicos en la

naturaleza, mediados a su vez por la diseminación de plásmidos tipo-pLD209. El conjunto de resultados de este trabajo señalan la capacidad de diferentes especies de *P. grupo putida* para intercambiar plásmidos conjugativos, y movilizar intra-genómicamente transposones portadores de *bla_{VIM-2}*, constituyendo así un reservorio ambiental de genes de resistencia de elevado impacto clínico. La transferencia de estas estructuras, originadas en especies ambientales, a especies patógenas (*i.e. P. aeruginosa, E. coli, S. marcescens*) ya ha podido ser demostrada.

III.1. Capítulo 2

En este capítulo se caracterizó el plásmido pNDM229 identificado en una cepa local de la especie *A. bereziniae* involucrado en la diseminación de *bla_{NDM-1}*, uno de los genes codificantes de MBLs más diseminados a nivel mundial. Asimismo, se caracterizaron los plásmidos contenidos en esta cepa, tomada como modelo de cepa clínico/ambiental, bajo la finalidad de evaluar el rol de especies *Acinetobacter no-baumannii* como reservorios de genes de resistencia. Específicamente:

- La identificación bacteriana del aislamiento HPC229, preliminarmente identificado como *A. lwoffii*, resultó ser *A. bereziniae* HPC229, según análisis de los marcadores ARNr 16S, *gyrB* y *rpoB*, y confirmado luego con orthoANI. Pudo reportarse así el primer aislamiento de *A. bereziniae* productor de NDM-1 en América y el segundo de esta especie reportada en el mundo.

- La caracterización molecular de la plataforma portadora de *bla_{NDM-1}* en HPC229 mostró que *bla_{NDM-1}* se encuentra asociado al transposón compuesto Tn125, el cual a su vez se halla inserto en un plásmido no conjugativo, de 44.560 pb, denominado pNDM229. No obstante, la identificación de dos copias de IS*Aba14* flanqueando el Tn125 aportó evidencia de la potencial formación de un nuevo EG con capacidad de movilizar no sólo a *bla_{NDM-1}*, sino también a *apha6*, codificante de una aminoglucósido-acetiltransferasa.

- Herramientas bioinformáticas empleadas para comparar pNDM229 contra plásmidos relacionados hallados en *A. lwoffii* y *A. bereziniae* (pNDM-BJ01 y pNDM-40-1, respectivamente) mostraron que pNDM229 conforma el grupo de plásmidos tipo-pNDM-BJ01. Estos plásmidos comparten los módulos de estabilidad y transferencia, exhibiendo así el mismo esqueleto plasmídico. Sin embargo, pNDM229 muestra características únicas, como el hallazgo de una segunda copia de IS*Aba14* corriente abajo de Tn125, y deleciones en genes esenciales del SST4 (*e.g. virB8-virB11* y *virD4*) que explicarían la falla en la recuperación de transconjugantes.

➤ Estudios comparativos de la secuencia nucleotídica de pNDM229 contra bases de datos de *Acinetobacter* spp. revelaron la existencia de numerosos plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1}; 21 plásmidos tipo-pNDM-BJ01 hallados en las especies *A. baumannii*, *A. bereziniae*, *A. calcoaceticus*, *A. dijkshoorniae*, *A. lwoffii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, y *Acinetobacter* sp.; y otros 5 plásmidos con esqueletos diferentes, por tanto no tipo-pNDM-BJ01, ligados a diferentes especies de *Acinetobacter*, como *A. baumannii*, *A. townneri*, *A. pittii* y *Acinetobacter* sp. El alineamiento de la región de adaptabilidad del conjunto de los plásmidos tipo-pNDM-BJ01 reveló numerosas plataformas distintas que evidencian rearrreglos genéticos. Estas variaciones incluyen esencialmente delecciones del Tn125, o bien adquisiciones de ISs, que conforman en algunos casos transposones compuestos potencialmente movilizables (e.g. “Tn14” en la cepa *A. bereziniae* pNDM229 local).

➤ El análisis comparativo de la región de adaptabilidad del conjunto de los plásmidos tipo-pNDM-BJ01 reveló una diversidad de plataformas. Aun así, se presentan regiones conservadas en ambos extremos de la misma e involucra en el extremo 5' la estructura IS*Aba14-aphA6*-IS*Aba125-bla*_{NDM-1}-*ble*, y en el extremo 3', el gen codificante de la resolvasa TnpR así como una región intergénica de 160 nt corriente arriba del mismo. Estas regiones comunes podrían proveer evidencias del origen de estas plataformas en este género. La búsqueda sistemática de estructuras ancestrales putativas en *Acinetobacter* spp. mostró regiones homólogas a ambas descritas arriba, en cepas de *A. parvus* (que aporta la región que incluye IS*Aba14* y *aphA6*) y de *A. pittii* (que aporta una región homóloga a la del pNDM-BJ01 carente del Tn125). El modelo hipotético que aquí se propone sugiere que la transposición del Tn125 sería una de las últimas etapas, la cual dio origen a pNDM-BJ01 detectado en *A. lwoffii*, a partir del cual derivan restantes plásmidos tipo-pNDM-BJ01 (como pNDM229). Este modelo agrega evidencias de que especies ambientales de *Acinetobacter* serían responsables del ensamble de estructuras tales como plásmidos tipo-pNDM-BJ01, así como de transposones compuestos potencialmente móviles, y por tanto aportan evidencias para considerar a este género como reservorio de genes de resistencia.

➤ La identificación y caracterización *in silico* de plásmidos co-residentes con pNDM229 en la cepa clínica *A. bereziniae* HPC229 empleando diversas herramientas bioinformáticas permitió distinguir regiones de replicación, estabilidad, transferencia y adaptabilidad de 5 plásmidos denominados pAbe229-114, pAbe229-15, pAbe229-9, pAbe229-4 y pAbe229-1. Comparaciones contra bases de datos mostraron que son plásmidos no reportados previamente. No obstante,

regiones parciales fueron detectadas en diversos plásmidos de *Acinetobacter* spp., evidenciando así regiones expuestas a THG entre diferentes especies de *Acinetobacter*.

➤ El análisis de pAbe229-114 (114.007 pb) reveló la presencia de 4 sistemas TA no contiguos, lo cual evidencia eventos genéticos de adquisición independientes. La región de transferencia está formada por un SST4 incompleto de elevado contenido GC (57%) mostrando su adquisición desde otro género bacteriano (*e.g.* *P. stutzeri*). La región de adaptabilidad mostró la presencia de numerosos genes involucrados en la resistencia a metales pesados, a estrés oxidativo como así también a bacteriófagos. Asimismo, se detectaron numerosos EG incluyendo islas genómicas, IS y transposones que revelan una larga historia de rearrreglos genéticos. Análisis comparativos mostraron que pAbe229-114 tiene un esqueleto similar al de pAV3 derivado de *A. venetianus*, mostrando la transferencia de EGM entre especies ambientales. No obstante, regiones únicas fueron detectadas en pAbe229-114, confirmando que el pasaje del plásmido por distintos hospedadores permite la adquisición de segmentos de genes contribuyendo así a su estructura quimérica.

➤ La estructura de los plásmidos pAbe229-15 (15.389 pb) y pAbe229-9 (9.154 pb) es similar, constituyendo plásmidos movilizables dado que poseen una región de transferencia *mobA-oriT*. Aun cuando la región de adaptabilidad es característica para cada uno de ellos, ambos tienen en común numerosos sitios de recombinación XerC/D, bordeando módulos de replicación, transferencia y adaptabilidad, lo cual sugiere la movilización de dichas regiones por eventos de recombinación mediados por sitios XerC/XerD. El análisis comparativo de ambos plásmidos contra bases de datos de *Acinetobacter* no-*berezinae* permitió detectar regiones de elevada identidad con secuencias presentes en otros plásmidos o cromosomas de cepas ambientales como clínicas. En conjunto, estos resultados sugieren que estos plásmidos movilizables constituirían estructuras quiméricas, derivadas de diversas especies de *Acinetobacter*.

➤ El análisis de pAbe229-4 (4.450 pb) mostró que, a pesar de no contener genes codificantes de replicasa y relaxasa, posee un sistema TA para su estabilización. Por su parte, el análisis de pAbe229-1 (1.329 pb) reveló ser un plásmido de reducido tamaño sin características funcionales conocidas, y constituye el elemento de menor tamaño reportado en *Acinetobacter* spp. Estos resultados muestran que las secuencias de estos plásmidos se hallan escasamente reportadas y su rol en HPC229 es enigmática.

➤ La búsqueda sistemática de sitios de recombinación XerC/D en los plásmidos de HPC229, mostró 5 en pAbe229-15; 4 en pAbe229-9; 2 en pAbe229-114; y 1 en pAbe229-4. Diez de estos sitios tienen un cr de 6 nucleótidos de longitud lo que llevó a generar un consenso para los sitios XerC/D en *A. bereziniae* HPC229. Además, tres de los plásmidos de la cepa local HPC229 transportan más de un sitio XerC/D, lo que sugiere que podrían mediar la diseminación de módulos flanqueados por dichos sitios, o de los plásmidos, a través de recombinación sitio-específica y/o la posible formación de co-integrados.

➤ La caracterización de los plásmidos pAbe229-114, pAbe229-15 y pAbe229-9 basada en la clasificación de las secuencias aminoacídicas de las replicasas mostró que los mismos forman parte de los “*Acinetobacter* Rep-3 Groups” (AR3G), incluyendo AR3G4, AR3G3 y AR3G6, respectivamente. Homólogos de dichas replicasas fueron hallados en diferentes miembros de *Acinetobacter*, incluyendo *A. baumannii*, *A. nosocomialis* y *A. calcoaceticus*. La observación de que las replicasas se encuentran tanto en cepas clínicas como ambientales revela el intercambio de módulos de replicación y/o plásmidos entre cepas de distintos nichos.

➤ La clasificación de las relaxasas de los plásmidos de HPC229 en base al análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de los 300 AA del N-terminal reveló que 3 de las 4 relaxasas identificadas pertenecen al subgrupo MOB_{Q1} incluyendo TraA (pNDM229), MobA (pAbe229-15) y MobA (pAbe229-9) mientras que TraI (pAbe229-114) se agrupa en un grupo filogenético diferente, MOB_{P111}. Aun cuando ninguno de los plásmidos de HPC229 se muestra conjugativo según análisis *in silico*, estos hallazgos revelan que estos plásmidos serían potencialmente movilizados.

➤ Bajo la finalidad de evaluar el putativo contenido plasmídico de otras cepas de *A. bereziniae*, se efectuó la búsqueda sistemática de marcadores plasmídicos en los genomas de 7 cepas depositadas de *A. bereziniae* así como de dos genomas de cepas aquí asignadas a esta especie mediante la herramienta bioinformática orthoANI (*Acinetobacter* Ag2 y WC-743). Así, se identificaron 16 secuencias de replicasas en los genomas de *A. bereziniae*, que agrupan en 11 de los 15 grupos caracterizados de AR3G, descritos en diferentes especies de *Acinetobacter*. Estos resultados sugieren que las cepas de *A. bereziniae* son capaces de albergar diversidad de plásmidos, y que los mismos podrían diseminarse entre distintos miembros del género *Acinetobacter*. La búsqueda de secuencias de relaxasas permitió identificar 8 proteínas entre el conjunto de genomas de *A. bereziniae* bajo estudio. Entre ellas, 6 corresponden a CHI-40-1 siendo 3 de ellas clasificadas como MOB_{Q1} y otras 3 como MOB_{Qaci}; mientras que las restantes 2 relaxasas de las cepas 507_ABAU y WC-743 corresponden a MOB_{Q1} y MOB_{Qaci},

respectivamente. Como resultado de este análisis se destaca que las cepas clínicas portadoras de *bla*_{NDM-1}, HPC229 y CHI-40-1, contienen un elevado número de relaxasas, pertenecientes a su vez a diferentes subgrupos. Como resultado del análisis global de ambos marcadores, evaluando la totalidad de cepas de *A. bereziniae* incluyendo la local, se destaca que las cepas clínicas portadoras de *bla*_{NDM-1}, HPC229 y CHI-40-1, contienen un elevado número de replicasas y relaxasas, desenmascarando así la diversidad de plásmidos que albergan.

➤ La búsqueda de sitios de recombinación XerC/D en los genomas de *A. bereziniae* bajo el objetivo de identificar módulos potencialmente intercambiables permitió identificar 55 putativos sitios. Entre ellos, 31 en CHI-40-1, 7 en 507_ABAU, 5 en Ag2, 4 en WC-743, 3 en KCTC 23199, y 2 en las cepas CIP 70.12 y NIPH3 y 1 en XH901. Los resultados muestran que las cepas clínicas portadoras de *bla*_{NDM-1}, CHI-40-1 y HPC229, son las que contienen mayor número de sitios. Ambas cepas contienen a su vez numerosos plásmidos, lo que sugiere una correlación entre cepas adaptadas al entorno hospitalario, y la presencia de sitios XerC/D en sus secuencias nucleotídicas. Por último, la similitud entre los consensos de sitios XerC/D generados en *A. baumannii* y *A. bereziniae* sugiere que los módulos flanqueados por XerC/D puedan ser intercambiados entre plásmidos de estas especies, y permite hipotetizar que el intercambio de secuencias genéticas entre miembros del género *Acinetobacter* mediado por recombinación sitio-específica sería un evento probable.

Los resultados de la caracterización de los plásmidos de la cepa clínica *A. bereziniae* HPC229 muestra la portación del plásmido pNDM-229 portador del gen de resistencia emergente *bla*_{NDM-1}. Se reporta aquí asimismo la coexistencia en esta cepa de 5 plásmidos adicionales, que exhiben una elevada diversidad en sus marcadores plasmídicos esenciales como los genes *rep*, y los genes *mob*. Aun cuando estos últimos no poseen genes de resistencia a antimicrobianos, se han detectado estructuras genéticas que aportan a su persistencia, como es el caso de las bombas de expulsión de metales pesados y la presencia de genes vinculados a la resistencia a bacteriófagos (*i.e.* en pAbe229-114); sistemas TA que aportan estabilidad a los mismos; y sitios probable de recombinación XerC/XerD que mediarían su diseminación (o de otros plásmidos) a través de recombinación sitio-específica y formación de co-integrados que aportan ventajas selectivas. La diversidad genética de plásmidos de la cepa *A. bereziniae* podría así explicar el rol de esta especie como nexo entre cepas clínicas y ambientales.



Referencias Bibliográficas

V. Referencias bibliográficas

- Adams, M.D., Bishop, B., and Wright, M.S. (2016). Quantitative assessment of insertion sequence impact on bacterial genome architecture. *Microb Genom* 2(7), e000062.
- Al-Jabri, Z., Zamudio, R., Horvath-Papp, E., Ralph, J. D., Al-Muharrami, Z., Rajakumar, K., and Oggioni, M. R. (2018). Integrase-Controlled Excision of Metal-Resistance Genomic Islands in *Acinetobacter baumannii*. *Genes*, 9(7):366.
- Almuzara M., Radice M., Gárate N., Kossman A., Cuirolo A., Santella G., Famiglietti A., Gutkind G., Vay C. (2007). VIM-2-producing *Pseudomonas putida*, Buenos Aires. *Emerg. Infect. Dis.*, 13:668-669.
- Almuzara M., Montaña S., Carulla M., Sly G., Fernandez J., Hernandez M., Moriano A., Traglia G.M., Bakai R., Ramirez M.S. (2018). Clinical cases of VIM-producing *Pseudomonas mendocina* from two burned patients. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 14:273-274.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3):403-410.
- Alvarez-Buylla A., Culebras E., and Picazo J. J. (2012). Identification of *Acinetobacter* species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infect. Genet. Evol.* 12:345-349.
- Antunes, L.C, Visca, P., Towner, K.J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis.*, 71(3):292-301.
- Arndt D., Grant J. R., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., & Wishart D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic acids research*, 44(1):16-21.
- Arpin C., Noury P., Boraud D., Coulange L., Manetti A., André C., et al. (2012). NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Resistant to Colistin in a French Community Patient without History of Foreign Travel. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56(6):3432.
- Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., Gerdes S., et al. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9:75.
- Babic M., Hujer A. M and Bonomo, RA. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. *Drug. Resis. Update.*, 9(3):142-56.
- Ballerini V., Marchiaro P., Cera G., Ernst A., Badano A., Nogueras M., Ochoa P., Belmonte A., Donadío D., Beraudo N., Viale A., Limansky A. (2011). Epidemiología molecular de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadoras de cabapenemasas tipo KPC en la ciudad de Rosario III Congreso Nacional, XVIII Reunión Anual, Redes de Laboratorios y Epidemiología, 5 al 7 de septiembre, Rosario.
- Bartolome B., Jubete Y., Martinez E., de la Cruz F. (1991). Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene* 102:75-8.
- Barton B.M., Harding G.P., Zuccarelli A.J. (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.*, 226(2):235-240.
- Baquero, F., Coque, T. M., and de la Cruz, F. (2011). Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55(8):3649-60.
- Bebrone C. (2007). Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.*, 74(12):1686-1701.
- Bennett P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, 153, S347-57.
- Benson G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic acids research*, 27(2):573-580.
- Berrazeg, M., Diene, S., Medjahed, L., Parola, P., Drissi, M., Raoult, D., et al. (2014). New Delhi Metallo- β -lactamase around the world: an eReview using Google Maps. *Euro. Surveill.*, 19:20809.

- Bertelli C., Laird M.R., Williams K.P., Simon Fraser University Research Computing Group, Lau B.Y., Hoad G., Winsor G.L., Brinkman F. (2017). IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic acids research*, 45(1):30-35.
- Bertelli, C., Tilley, K., Brinkman F. (2018). Microbial genomic island discovery, visualization and analysis, Briefings in Bioinformatics, bby042. doi.org/10.1093/bib/bby042
- Bertini, A., Poirel, L., Mugnier, P.D., Villa, L., Nordmann, P., Carattoli, A. (2010). Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 54:4168-4177.
- Betteridge T., Partridge S.R., Iredell J.R., and Stokes H.W. (2011). Genetic Context and Structural Diversity of Class 1 Integrons from Human Commensal Bacteria in a Hospital Intensive Care Unit. *Antimicrob Agents Chemother.*, 55:3939-3943.
- Blackwell, G.A., Hall, R.M. (2017) The *tet39* determinant and the *msrE-mphE* genes in *Acinetobacter* plasmids are each part of discrete modules flanked by inversely oriented pdif (XerC-XerD) sites. *Antimicrob Agents Chemother.*, 61(8): e00780-17.
- Bogaerts P., Bouchahrouf W., Lissior B., Denis O., Glupczynski Y. (2011). IMP-13-producing *Pseudomonas monteilii* recovered in a hospital environment, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66 (10):2434-2435.
- Bonnin R.A., Ocampo-Sosa A.A., Poirel L., Guet-Revillet H., Nordmann P. (2012). Biochemical and genetic characterization of carbapenem-hydrolyzing β -lactamase OXA-229 from *Acinetobacter bereziniae*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 56: 3923-3927.
- Bonomo R. A. (2011). New Delhi Metallo- β -Lactamase and Multidrug Resistance: A Global SOS? *Clin. Infect. Dis.*, 52(4):485-487.
- Bontron, S., Nordmann, P., and Poirel, L. (2016). Transposition of Tn125 Encoding the NDM-1 Carbapenemase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60(12):7245-7251.
- Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2017). Characterization of the pJB12 Plasmid from *Pseudomonas aeruginosa* Reveals Tn6352, a Novel Putative Transposon Associated with Mobilization of the *bla*_{VIM-2}-Harboring In58 Integron. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 61(5): e02532-16.
- Bou G., Fernández-Olmos A., García C., Sáez-Nieto J.A., Valdezate S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 29:601-608
- Brovedan, M., Marchiaro, P.M., Moran-Barrio, J., Cameranesi, M., Cera, G., Rinaudo, M., Viale A.M., Limansky, A. S. (2015). Complete Sequence of a *bla*_{NDM-1}-Harboring Plasmid in an *Acinetobacter bereziniae* Clinical Strain Isolated in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 59(10):6667-6669.
- Brovedan, M., Marchiaro, P.M., Moran-Barrio, J., Reval, S., Cameranesi, M., Brambilla, L., Viale A.M., Limansky, A. S. (2016). Draft Genome Sequence of *Acinetobacter bereziniae* HPC229, a Carbapenem-Resistant Clinical Strain from Argentina Harboring *bla*_{NDM-1}. *Genome Announc* 4(2).
- Bush K. and Jacoby G. A. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54:969-976.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8): a025247.
- Bush K. (2018). Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01076-18.
- Cameranesi, M.M.; Limansky, A.S.; Morán-Barrio, J.; Repizo, G.D. and Viale, A.M. (2017). Three novel *Acinetobacter baumannii* plasmid replicase-homology groups inferred from the analysis of a multidrug-resistant clinical strain isolated in Argentina. *J. Infect. Dis. Epidemiol.* 3:46.
- Cameranesi M.M.; Morán-Barrio J.; Limansky A.S.; Repizo G.D. and Viale A.M. (2018). Site-Specific Recombination at XerC/D Sites Mediates the Formation and Resolution of Plasmid Co-integrates Carrying a *bla*_{OXA-58}- and TnaphA6-Resistance Module in *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* 9:66.

- Campos, J. C., da Silva, M. J., dos Santos, P. R., Barros, E. M., Pereira, M., Seco, B. M., Magagnin, C. M., Leiroz, L. K., et al. (2015). Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for *bla*_{NDM-1} Dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrob Agents Chemother.*, 59(12):7387-95.
- Cantón R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin. Microbiol. Infect.*, 15:20-25.
- Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins K.L. & Threlfall E.J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Meth.*, 63:219-228.
- Carattoli A., Villa L., Poirel L., Bonnin R.A., & Nordmann, P. (2012). Evolution of IncA/C *bla*_{CMY-2}-carrying plasmids by acquisition of the *bla*_{NDM-1} carbapenemase gene. *Antimicrob Agents Chemother.*, 56(2):783-786.
- Carvalho-Assef A.P, Gomes M.Z.R., Silva A.R.A, Werneck L., Rodrigues C.A.S, Souza M.J. and Asensi M.D. (2010). IMP-16 in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri*: potential reservoirs of multidrug resistance. *J. Med. Microbiol.*, 59:1030-1031.
- Castanheira M., Toleman M A., Jones R.N, Schmidt F J. and Walsh T. (2004). Molecular characterization of a β -lactamase, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.*, 48:4654-4661.
- Cayô R, Leme RC, Streling AP, Matos AP, Nodari CS, Chaves JR, et al. (2017). *Serratia marcescens* harboring SME-4 in Brazil: a silent threat. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 87:357-358.
- Cayô R., Streling A., Nodari C., Matos A., de Paula Luz A., Dijkshoorn L., Pignatari A., Gales A. (2018). *J. Med. Microbiol.*, 67(5):628-630.
- Cejas D., Almuzara M., Santella G., Tuduri A., Palombarani S., Figueroa S., Gutkind G., Radice M. (2008). Phenotypic and genotypic characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a Buenos Aires hospital. *Rev. Argent. Microbiol.*, 40:238-245.
- Chagas T.P.G., Carvalho-Assef A.P.D.A., Martins Aires C.A., Bertocini R., Asensi M.D. (2015). Detection of an NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* strain in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* 3:147-148.
- Chatterjee S., Mondal A., Mitra S., Basu S. (2017). *Acinetobacter baumannii* transfers the *bla*_{NDM-1} gene via outer membrane vesicles, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72 (8):2201-2207.
- Chan W.T., Espinosa M. and Yeo C.C. (2016). Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems. *Front. Mol. Biosci.* 3:9.
- Charan, J., Mulla, S., Ryavanki, S., and Kantharia, N. (2012). New Delhi Metallo-beta lactamase-1 containing enterobacteriaceae: origin, diagnosis, treatment and public health concern. *The Pan African medical journal*, 11:22.
- Chen Y.T., Lin A.C., Siu L.K., Koh T.H. (2012a). Sequence of Closely Related Plasmids Encoding *bla*_{NDM-1} in Two Unrelated *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Singapore. *PLOS ONE* 7(11): e48737.
- Chen Y., Cui Y., Pu F., Jiang G., Zhao X., Yuan Y., Zhao W., et al. (2012b). Draft genome sequence of an *Acinetobacter* genomic species 3 strain harboring a *bla*_(NDM-1) gene. *Journal of bacteriology*, 194(1):204-205.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th edition. Document M100-S28. Wayne, PA. USA.
- Collis, C. M., Kim, M. J., Partridge, S. R., Stokes, H. W., and Hall, R. M. (2002). Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *Journal of bacteriology*, 184(11):3017-26.
- Colloms, S.D. (2013). The topology of plasmid-monomerizing Xer site-specific recombination. *Biochem Soc Trans* 41:589-594.

- Cornaglia, G., Akova, M., Amicosante, G., Cantón, R., Cauda, R., Docquier, J.-D., Edelstein, M., Frère, J.-M., Fuzi, M., et al. (2007). Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 29:380-388.
- Cornaglia, G., Giamarellou, H., Rossolini, G.M. (2011). Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect. Dis.*, 11(5):381-393.
- Craig N.L. (1997). Target site selection in transposition. *Annu Rev Biochem* 66:437-474.
- D'Andrea, M.M., Giani, T., D'Arezzo, S., Capone, A., Petrosillo, N., Visca, P., Luzzaro, F., Rossolini, G.M. (2009). Characterization of pABVA01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:3528-33.
- Darmon E. & Leach D.R.F. (2014). Bacterial genome instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 78:1-39.
- Das B., Martínez E., Midonet C., Barre F-X. (2013). Integrative mobile elements exploiting Xer recombination. *Trends Microbiol*, 21:23-30.
- Davies J. and Davies D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, 74:417-433.
- De Belder D., Faccone D., Tijet N., Melano R.G., Rapoport M., Petroni A., et al. (2017). Novel class 1 Integrons and sequence types in VIM-2 and VIM-11-producing clinical strains of *Enterobacter cloacae*. *Infect Genet Evol.*, 54:374–378. 10.1016/j.meegid.2017.07.019.
- De Belder D., Lucero C., Rapoport M., Rosato A., Faccone D., Petroni A., Pasteran F., Albornoz E., Corso A., Gomez S. (2018). Genetic Diversity of KPC-Producing *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, and *Citrobacter freundii* Isolates from Argentina. *Microbial Drug Resistance*, 24(7): 958-965.
- Díaz María S., Trabajo Final Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica “Plataformas genéticas de metalo- β -lactamasas VIM-2 en aislamientos clínicos de *Pseudomonas putida* resistentes a carbapenemes”. Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. 2014.
- Di Conza J.A., Gutkind G. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. *Rev. Argent. Microbiol.*, 42:63-78.
- Dijkmans A.C., Wilms E.B., Kamerling I.M., Birkhoff W., Ortiz-Zacarías N.V., van Nieuwkoop C., Verbrugh H.A., Touw D.J. (2015). Colistin: Revival of an Old Polymyxin Antibiotic. *Ther Drug Monit.*, 37(4):419-427.
- Domínguez N.M., Hackett K.T., Dillard J.P. (2011). XerCD-mediated site-specific recombination leads to loss of the 57-kilobase gonococcal genetic island. *J Bacteriol*, 193:377-388.
- Dorsey, C. W., Tomaras, A. P., and Actis, L. A. (2006). Sequence and organization of pMAC, an *Acinetobacter baumannii* plasmid harboring genes involved in organic peroxide resistance. *Plasmid*, 56:112-123.
- Dortet L., Poirel L., Nordmann P. (2014). Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. *Biomed Res Int*. Article ID 249856.
- Dortet, L., Poirel, L., Abbas, S., Oueslati, S., and Nordmann, P. (2015). Genetic and Biochemical Characterization of FRI-1, a Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 59(12):7420-7425.
- Dortet L. Girlich D., Virlovet A-L, Poirel L., Nordmann P., Iorga B.I., Naas T. (2017). Characterization of BRPMBL, the bleomycin resistance protein associated with the carbapenemase NDM. *Antimicrob Agents Chemother.*, 61:e02413-16.
- Drawz, S. M., and Bonomo, R. A. (2010). Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*, 23(1):160-201.
- Elena, A., Cejas, D., Magariños, F., Jewtuchowicz, V., Facente, A., Gutkind, G., Di Conza, J., Radice, M. (2018). Spread of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Harboring an IncA/C1 Plasmid Encoding

- IMP-8 and Its Recruitment into an Unrelated MCR-1-Containing Isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(6), e02414-17.
- El Salabi A., Borra P.S., Toleman M.A., Samuelsen O., Walsh T.R. (2012). Genetic and biochemical characterization of a novel metallo- β -lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56(5):2241-2245.
- Escandón-Vargas K., Reyes, S., Gutiérrez S., & Villegas M. V. (2017). The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev of Anti infective Therapy*, 15(3):277-297.
- Espinal P, Mosqueda N, Telli M, van der Reijden T, Rolo D, Fernández-Orth D, Dijkshoorn L, Roca I, Vila J. (2015). Identification of NDM-1 in a putatively novel *Acinetobacter* species ("NB14") closely related to *Acinetobacter pittii*. *Antimicrob Agents Chemother* 59:6657-6660.
- Evans, B.A. and Amyes, S.G.B. (2014). OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.*, 27:241-263.
- Faccone D., Pasteran F., Albornoz E., Gonzalez L., Veliz O., Prieto M., Bucciarelli R., Callejo R., Corso A. (2014). Human infections due to *Pseudomonas chlororaphis* and *Pseudomonas oleovorans* harboring new *bla*_{VIM-2}-borne integrons. *Infect Genet Evol*, 28:276-277.
- Faccone D, Martino F, Pasteran F, Albornoz E, Biondi E, Vazquez M, Rapoport M, Rodrigo V, De Belder D, Gomez S, Corso A (2019). Multiple clones of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter ursingii* in a children hospital from Argentina. *Infect Genet Evol.*, 67:145-149.
- Farrugia D.N., Elbourne L.D., Mabbutt B.C., & Paulsen I.T. (2015). A novel family of integrases associated with prophages and genomic islands integrated within the tRNA-dihydrouridine synthase A (*dusA*) gene. *Nucleic acids research*, 43(9):4547-4557.
- Feng Y, Yang P, Wang X, Zong Z. (2016). Characterization of *Acinetobacter johnsonii* isolate XBB1 carrying nine plasmids and encoding NDM-1, OXA-58 and PER-1 by genome sequencing. *J Antimicrob Chemother.*, 71:71-75.
- Finn R.D., Coghill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Mistry J., Mitchell A.L., Potter S.C., et al. (2015). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic acids research*, 44(1), 279-285.
- Fiorilli G., Faccone D., Lopardo H., Callejo R., Rapoport M., Prieto M., Galas M., Pasteran F. (2010). Emergence of metallo- β -lactamases in *Acinetobacter* spp clinical isolates from Argentina. *Rev. Esp. Quimioter.*, 23:100-02.
- Francia M.V., Varsaki A., Garcillán-Barcia M.P., Latorre A., Drainas C. and de la Cruz F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28:79-100.
- Frey J., Bagdasarian M.M., Bagdasarian M. (1992). Replication and copy number control of the broad-host-range plasmid RSF1010, *Gene*, 113:101-106.
- Frost L.S, Leplae R, Summers A.O., Toussaint A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(9):722-732.
- Fondi, M., Bacci, G., Brilli, M., Papaleo, M.C., Mengoni, A., Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Fani, R. (2010). Exploring the evolutionary dynamics of plasmids: the *Acinetobacter* pan-plasmidome. *BMC Evol Biol*, 10:59.
- Galleni M., Lamotte-Brasseur J., Rossolini, G.M., Spence, J., Dideber, O., and Frere, J M. And the metallo- β -lactamase Working Group. (2001) Standard Numbering Scheme for Class B β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45:660-663.
- Gallagher L.A., Lee S.A., and Manoil C. (2017). Importance of Core Genome Functions for an Extreme Antibiotic Resistance Trait. *MBio* 8(6).
- Garcia-Garcera, M., Touchon, M., Brisse, S., and Rocha, E. (2017). Metagenomic assessment of the interplay between the environment and the genetic diversification of *Acinetobacter*. *Environmental microbiology*, 19(12):5010-5024.

- Garcillan-Barcia M.P., De La Cruz F. (2002). Distribution of IS91 family insertion sequences in bacterial genomes: evolutionary implications. *FEMS Microbiol Ecol*, 42:303-313.
- Garcillán-Barcia M.P., Francia M.V, de la Cruz F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev.*, 33(3):657-687.
- Garcillán-Barcia M.P., Alvarado A and de la Cruz F. (2011). Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol. Rev.*, 35:936-956.
- Gardner, M.N., Deane, S.M., and Rawlings, D.E. (2001). Isolation of a new broad-host-range IncQ-like plasmid, pTC-F14, from the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* and analysis of the plasmid replicon. *J Bacteriol*, 183(11):3303-3309.
- Gerdes K., Moller-Jensen J., Bugge Jensen R. (2000). Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Molecular microbiology*, 37(3):455-66.
- Gillings M., Boucher Y., Labbate M., Holmes A., Krishnan S., Holley M., and Stokes H.W. (2008). The Evolution of Class 1 Integrins and the Rise of Antibiotic Resistance. *J. Bacteriol.*, 190:5095-5100.
- Gillings M. R. (2014). Integrins: past, present, and future. *Microbiology and molecular biology reviews*, 78(2):257-277.
- Gillings, M.R. (2017). Class 1 integrins as invasive species. *Current Opinion in Microbiology*, 38:10-15.
- Girlich, D., Poirel, L., and Nordmann, P. (2009). Novel ambler class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from a *Pseudomonas fluorescens* isolate from the Seine River, Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother.*, 54(1), 328-32.
- Goldfarb T., Sberro H., Weinstock E., Cohen O., Doron S., Charpak-Amikam Y., et al. (2015). BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J*, 34(2):169-183.
- Gomez S. A., Pasteran F. G., Faccone D., Tijet N., Rapoport M., Lucero C., Lastovetska O., Albornoz E., Galas M., KPC Group, R. G. Melano, A. Corso and A. Petroni. (2011a). Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin. Microbiol. Infect.*, 17(10):1520-1524.
- Gomez S., Rapoport M., Togneri A., Viegas-Caetano J., Faccone D., Corso A., Petroni A., Pasteran F. (2011b). Emergence of metallo-beta-lactamases in Enterobacteriaceae from Argentina. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 69:94-97.
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in microbiology*, 6:214.
- González G.R., Mella S.M, Zemelman R.Z, Bello H.T, Domínguez M.Y. (2004). Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev. Méd. Chile*, 132:619-626.
- Gordon N.C., Wareham D.W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 35:219-226.
- Grant J.R., and Stothard P. (2008). The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res*, 36:181-184.
- Grosso F., Silva L., Sousa C., Ramos H., Quinteira S., and Peixe L. (2015). Extending the reservoir of *bla_{IMP-5}*: the emerging pathogen *Acinetobacter bereziniae*. *Future Microbiology*, 10:1609-1613.
- Guglielmini J., de la Cruz F., and Rocha E.P.C. (2012). Evolution of Conjugation and Type IV Secretion Systems. *Molecular Biology and Evolution*, 30(2):315-331.doi:10.1093/molbev/mss221.
- Guilhot, C., Otal, I., Van Rompaey, I., Martin, C., and Gicquel, B. (1994). Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries. *Journal of bacteriology*, 176(2):535-539.
- Haines A.S., Akhtar P., Stephens E.R., et al. (2006). Plasmids from freshwater environments capable of IncQ retrotransfer are diverse and include pQKH54, a new IncP-1 subgroup archetype. *Microbiology* 152:2689-2701.
- Hall, R. M., Brown, H. J., Brookes, D. E., and Stokes, H. W. (1994). Integrins found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *Journal of bacteriology*, 176(20):6286-6294.

- Hall B.G, and Barlow M. (2004). Evolution of the serine β -lactamases: past, present and future. *Drug Resist. Update.*, 7:111-123.
- Hamidian, M., Hawkey, J., Holt, K.E., Hall, R.M. (2015). Genome sequence of *Acinetobacter baumannii* strain D36, an antibiotic-resistant isolate from lineage 2 of global clone 1. *Genome Announc.* 3(6). pii: e01478-15. doi: 10.1128/genomeA.01478-15.
- Hamouda A., Findlay J. and Amyes S.G.B. (2011). Carbapenems: do they have a future?. *J Med. Microbil.*, 60, 1230-1231.
- Hayes, F. (2003). Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science*, 301:1496-1499.
- Helfand M.S. and Bonomo R.A. (2005) Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum β -lactamases and metallo- β -lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. *Current Opinion in Pharmacology*, 5:452-458.
- Heritier, C., L. Poirel, and P. Nordmann. (2004). Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing Ambler class D β -lactamase from *Shewanella* algae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1670-1675.
- Ho, P. L., Lo, W. U., Yeung, M. K., Lin, C. H., Chow, K. H., et al. (2011). Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong. *PloS one*, 6(3), e17989.
- Hodgman T.C., Griffiths H., Summers D.K. (1998). Nucleoprotein architecture and ColE1 dimer resolution: a hypothesis. *Molecular microbiology*, 29(2):545-558.
- Holbrook S., Garneau-Tsodikova S. (2018). Evaluation of Aminoglycoside and Carbapenem Resistance in a Collection of Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Microb Drug Resist.* (7):1020-1030.
- Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I. H., Jeong, S. H., Kang, H. K., & Lee, K. (2015). Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & chemotherapy*, 47(2):81-97.
- Hong JS, Yoon E-J, Lee H, Jeong SH, Lee K. (2016). Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 isolates carrying *bla*_{IMP-6} and emergence of *bla*_{GES-24} and *bla*_{IMP-10} on novel genomic islands PAGI-15 and -16 in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother.*, 60:7216-7223.
- Hong J.S, Yoon E., Song W., Seo Y., et al (2018). Microbial Drug Resistance. Jun 2018. ahead of print <http://doi.org/10.1089/mdr.2017.0257>.
- Hu, H., Hu, Y., Pan, Y., Liang, H., Wang, H., Wang, X., et al. (2012). Novel plasmid and its variant harboring both a *bla*_{NDM-1} gene and type IV secretion system in clinical isolates of *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(4):1698-1702.
- Hu H., Manos J. (2015). Pulsed-field gel electrophoresis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol Biol.*, 1301:157-170.
- Ibrahim A., Gerner-Smidt P., Liesack W. (1997). Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol*, 47:837-841.
- Jacoby G. A. and Munoz-Price L. S. (2005). Mechanisms of disease. The New β -Lactamases. *N. Engl. J. Med.*, 352, 380-91.
- Joly-Guillou, M. (2005). Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clinical Microbiology and Infection*, 11:868-873.
- Jones LS, Toleman MA, Weeks JL, Howe RA, Walsh TR, Kumarasamy KK. (2014). Plasmid carriage of *bla*_{NDM-1} in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates from India. *Antimicrob Agents Chemother*, 58:4211-4213.

- Jones, L.S., Carvalho, M.J., Toleman, M.A., White, P.L., Connor, T.R., Mushtaq, A., et al. (2015). Characterization of plasmids in extensively drug-resistant *Acinetobacter* strains isolated in India and Pakistan. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(2):923-929.
- Juan C., Zamorano L., Mena A., Albertí S., Pérez J.L., Oliver A. (2010). Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 65:474-478.
- Jurenaite M., Markuckas A., and Suziedeliene E. (2013). Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*, 195(14):3165-3172.
- Kamali-Moghaddam, M., and Sundstom L. (2001). Arrayed transposase binding sequences on the ends of transposon Tn5090/Tn402. *Nucleic Acids Res.*, 29:1005-1011.
- Kammler M., Schön C., & Hantke K. (1993). Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 175(19):6212-6219.
- Khan, A. U., Maryam, L., and Zarrilli, R. (2017). Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol.* 17:101.
- Kholodii G.Y., Mindlin S.Z., Bass I.A., Yurieva O.V., Minakhina S.V., Nikiforov V.G. (1995). Four genes, two ends, and a *res* region are involved in transposition of Tn5053: a paradigm for a novel family of transposons carrying either a *mer* operon or an integron. *Mol. Microbiol.*, 17:1189-1200.
- Kishii K., Kikuchi K., Matsuda N., Yoshida A., Okuzumi K., Uetera Y., et al. (2014). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for species identification of *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures. *Clin Microbiol Infect.*, 20(5):424-430.
- Kleinheinz K.A., Joensen K.G., & Larsen, M.V. (2014). Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. *Bacteriophage*, 4(1), e27943.
- Koh T.H., Yeng W. G.C., y Sng L.H. (2004). IMP-1 and a Novel Metallo- β -Lactamase, VIM-6, in Fluorescent *Pseudomonads* Isolated in Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48:2334-2336.
- Konieczny, I., Bury, K., Wawrzycka, A., Wegrzyn, K. (2014). Iteron plasmids. *Microbiol. Spectr.* 2: PLAS-0026-2014.
- Krahn T., Gilmour C., Tilak J., Fraud S., Kerr N., Lau C.H., et al. (2012). Determinants of intrinsic aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(11):5591-5602.
- Kubota H., Uwamino Y., Matsui M., Sekizuka T., Suzuki Y., Okuno R., et al. (2018) FRI-4 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* complex isolated in Tokyo, Japan, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73 (11):2969-2972.
- Kuo SC, Fung CP, Lee YT, Chen CP, Chen TL. (2010). Bacteremia due to *Acinetobacter* genomic species 10. *J. Clin. Microbiol.*, 48:586-590.
- Labbate, M., Roy Chowdhury, P., & Stokes, H. W. (2008). A class 1 integron present in a human commensal has a hybrid transposition module compared to Tn402: evidence of interaction with mobile DNA from natural environments. *Journal of bacteriology*, 190(15):5318-27.
- Labarca J. A., Salles M. J., Seas C. & Guzmán-Blanco M. (2016). Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America, *Critical Reviews in Microbiology*, 42:276-292.
- Lagatolla C., Edalucci E., Dolzani L., Riccio M. L., De Luca F., Medessi E., Rossolini G.M. and Tonin E.A. (2006). Molecular Evolution of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in a Nosocomial Setting of High-Level Endemicity. *J. Clin. Microbiol.*, 44(7):2348-2353.
- Lartigue, M. F., L. Poirel, D. Aubert, and P. Nordmann. (2006). In vitro analysis of ISEcpIB-mediated mobilization of naturally occurring betalactamase gene *bla*_{CTX-M} of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50:1282-1286.

- La Scola, B., Gundi, V. A., Khamis, A., & Raoult, D. (2006). Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *Journal of clinical microbiology*, 44(3):827-32.
- Lauretti L., Riccio M. L., Mazzariol A., Cornaglia G., Amicosante G., Fontana R. and Rossolini G. M. (1999) Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.*, 43:1584-1590.
- Levings R.S., Djordjevic S.P., Hall R.M. (2008). SGI2, a relative of *Salmonella* genomic island SGI1 with an independent origin. *Antimicrob Agents Chemother.*, 52:2529-2537.
- Lean, S.S. and Yeo, C.C. (2017). Small, Enigmatic Plasmids of the Nosocomial Pathogen, *Acinetobacter baumannii*: Good, Bad, Who Knows? *Front Microbiol* 8:1547.
- Limansky A.S. and Viale A.M. (2002) Can composition and structural features of oligonucleotides contribute to their wide-scale applicability as random PCR primers in mapping bacterial genome diversity? *J. Microbiol. Methods.*, 50(3):291-297.
- Lister P.D., Wolter D.J., and Hanson N.D. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms *Clin. Microbiol. Rev.*, 22(4):582-610.
- Liu, Z., Li, J., Wang, X., Liu, D., Ke, Y., Wang, Y., & Shen, J. (2018). Novel Variant of New Delhi Metallo-β-lactamase, NDM-20, in *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 9, 248.
- Livermore D.M. (2002). Multiple Mechanisms of antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our Worst Nightmare? *Clin. Infect. Dis.*, 34:634-40.
- Lee K., Yum J.H., Yong D., Lee H.M., Kim H.D., Dockier J.D, Rossolini G. M. and Chong Y. (2005). Novel acquired metallo-β-lactamase gene, *bla_{SIM-1}*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49:4485-4491.
- Lee K, Kim CK, Hong SG et al. (2010). Characteristics of clinical isolates of *Acinetobacter* genomospecies 10 carrying two different metallo-beta-lactamases. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36(3):259-263.
- Lee I., Kim Y.O., Park S.C., Chun J. (2015). OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66:1100-1103.
- Leiros H.K., Borra P.S., Brandsdal B.O., Edvardsen K.S., Spencer J., Walsh T.R., Samuelsen O. (2012) Crystal Structure of the Mobile Metallo-β-Lactamase AIM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*: Insights into Antibiotic Binding and the role of Gln157. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56(8):4341-4353.
- Logan, L. K., and Weinstein, R. A. (2017). The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *The Journal of infectious diseases*, 215:28-36.
- Lombardi G., Luzzaro F., Docquie J.D, Letizia M.L., Perilli M., Coli A., Amicosante G., Rossolini G.M., and Toniolo A. (2002). Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 Metallo-β-Lactamase. *J. Clin. Microbiol.*, 40:4051-4055.
- Lomovskaya, O., Sun, D., Rubio-Aparicio, D., Nelson, K., Tsivkovski, R., Griffith, D. C., & Dudley, M. N. (2017). Vaborbactam: Spectrum of Beta-Lactamase Inhibition and Impact of Resistance Mechanisms on Activity in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 61(11), e01443-17.
- Lopes B.S., Al-Hassan L. and Amyes S.G. (2012). IS*Aba*825 controls the expression of the chromosomal *bla_{OXA-51-like}* and the plasmid borne *bla_{OXA-58}* gene in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from the USA. *Clinical Microbiology and Infection*, 18:446-451.
- López-García, A., Rocha-Gracia, R., Bello-López, E., Juárez-Zelocualtecalt, C., Sáenz, Y., Castañeda-Lucio, M., López-Pliego, L., et al. (2018). Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican Hospital. *Infection and drug resistance*, 11:1523-1536.

- Loucif L., Cherak Z., Chamlal N., Bendjama E., Gacemi-Kirane D., Grainat N., Rolain J-M. (2017). First detection of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas putida* in *Blattella germanica* cockroaches in an Algerian hospital. *Antimicrob Agents Chemother.*, 61:e00357-17.
- Lunin V.V., Dobrovetsky E., Khutoreskaya G., Zhang R., Joachimiak A., Doyle D.A., Bochkarev A., Maguire, M.E., Edwards A.M., Koth C.M. (2006). Crystal structure of the CorA Mg²⁺ transporter. *Nature*, 440(7085):833-7.
- Medeiros A.A. (1997). Evolution and Dissemination of β -Lactamases Accelerated by Generations of (β -Lactam antibiotics). *Clin. Infect. Dis.*, 24(1):19-45.
- Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J.F, et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18(3):268-281.
- Maldonado N., Robledo C., Robledo J. (2018). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio* 2018; 22(1):35-45.
- Manchanda V., Rai S., Gupta S., Rautela R.S., Chopra R., Rawat D.S., Verma N., Singh N.P., Kaur I.R., Bhalla P. (2011). Development of TaqMan real-time polymerase chain reaction for the detection of the newly emerging form of carbapenem resistance gene in clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol*, 29:249-53.
- Manohar P., Babu S., Bozdogan B., Ramesh N. (2018). Identification of bla_{DIM-1} metallo- β -lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Tamil Nadu, India. *J Glob Antimicrob Resist.*, 13:7-8.
- Matagne A., Lamotte-Brasseur J. and Frère J.M. (1998). Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J. Biochem J.*, 330:581-598.
- Marchiaro P., Mussi, M. A., Ballerini, V., Pasteran, F., Viale, A. M., Vila, A. J. and A. S. Limansky. (2005). Sensitive EDTA-Based Microbiological Assays for the Detection of Metallo- β -lactamases in Non-Fermentative Gram-Negative Bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 43:5648-5652.
- Marchiaro P., Viale A.M., Ballerini V., Rossignol G.,Vila A.J., Limansky A. (2010). First report of a Tn402-like class 1 integron carrying bla_{VIM-2} in *Pseudomonas putida* from Argentina. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16:126-131.
- Marchiaro P. (2012). Trabajo de Tesis Doctoral: “ β -lactamasas de Patógenos Oportunistas Gram Negativos: Detección y Caracterización Molecular”. Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.
- Marchiaro, P.M., Brambilla, L., Morán-Barrio, J., Revale, S., Pasteran, F., Vila, A.J., Viale, A.M., Limansky, A.S. (2014a). The complete nucleotide sequence of the carbapenem resistance-conferring conjugative plasmid pLD209 from a *Pseudomonas putida* clinical strain reveals a chimeric design formed by modules derived from both environmental and clinical bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58(3), 1816-21.
- Marchiaro P., Ferrero S., Ballerini V., Pasteran F., Faccone D., Viale A., Limansky A. (2014b). *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- β -lactamasa SPM-1 en Argentina: una cepa autóctona? XIV Congreso Sociedad Argentina de Infectología. Rosario. Presentación Oral.
- Marchler-Bauer A., Derbyshire M.K., Gonzales,N.R., Lu S., Chitsaz F., Geer L.Y., et al. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* 43:222-226.
- Marquez-Ortiz, R. A., Haggerty, L., Olarte, N., Duarte, C., Garza-Ramos, U., Silva-Sanchez, J., Castro, B. E., Sim, E. M., Beltran, M., et al. (2017). Genomic Epidemiology of NDM-1-Encoding Plasmids in Latin American Clinical Isolates Reveals Insights into the Evolution of Multidrug Resistance. *Genome biology and evolution*, 9(6):1725-1741.
- Martínez J. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. R. Soc. B.*, 276:2521-2530.
- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiology*, 4, 608-620.

- Meireles C., Costa G., Guinote I., Albuquerque T., Botelho A., Cordeiro C., Freire P. (2013). *Pseudomonas putida* are environmental reservoirs of antimicrobial resistance to β -lactamic antibiotics. *World J Microbiol Biotechnol.*, 29:1317-1325.
- Meyer, R. (2009). Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids. *Plasmid*, 62(2):57-70.
- Midonet C, Barre F.X. (2014). Xer site-specific recombination: promoting vertical and horizontal transmission of genetic information. *Microbiol Spectrum*, 2(6):MDNA3-0056-2014.
- Minakhina S., Kholodii G., Mindlin S., Yurieva O., Nikiforov V. (1999). Tn5053 family transposons are *res* site hunters sensing plasmidal *res* sites occupied by cognate resolvases. *Mol Microbiol* 33:1059-68.
- Mindlin S., Petrenko A., Kurakov A., Beletsky A., Mardanov A., and Petrova M. (2016). Resistance of Permafrost and Modern *Acinetobacter lwoffii* Strains to Heavy Metals and Arsenic Revealed by Genome Analysis. *Biomed Res Int* 2016, 3970831.
- Mojica, M.F., Bonomo, R.A., & Fast, W. (2016). B1-Metallo- β -Lactamases: Where Do We Stand?. *Current drug targets*, 17(9):1029-50.
- Molin C. (2016). Detección Fenotípica de Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* en Pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas San Lorenzo de febrero a julio 2013. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 14(1):25-31.
- Molina L, Bernal P, Udaondo Z, Segura A, Ramos J.L. (2013). Complete genome sequence of a *Pseudomonas putida* clinical isolate, strain H8234. *Genome Announc.* 1(4):e00496-13.
- Montaña, S., Cittadini, R., Del Castillo, M., Uong, S., Lazzaro, T., Almuzara, M., Barberis, C., Vay, C., Ramírez, M. S. (2016). Presence of New Delhi metallo- β -lactamase gene (NDM-1) in a clinical isolate of *Acinetobacter junii* in Argentina. *New microbes and new infections*, 11:43-4.
- Montaña, S., Palombarani, S., Carulla, M., Kunst, A., Rodriguez, C. H., Nastro, M., Vay, C., Ramirez, M. S., Almuzara, M. (2017). First case of bacteraemia due to *Acinetobacter schindleri* harbouring *bla*_{NDM-1} in an immunocompromised patient. *New microbes and new infections*, 21:28-30.
- Mulet M., Lalucat J., García-Valdés E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12:1513-1530.
- Mulet M., Gomila M., Scotta C., Sánchez D., Lalucat J., García-Valdés E., (2012). Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-off light mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 35:455-464.
- Mulet M., García-Valdés E., and Lalucat J. (2013). Phylogenetic affiliation of *Pseudomonas putida* biovar A and B strains. *Res. Microbiol.* 164:351-359.
- Mulet M., Gomila M., Ramírez A., Cardew S., Moore, E.R., Lalucat J., García-Valdés E. (2017). Uncommonly isolated clinical *Pseudomonas*: identification and phylogenetic assignation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36:351-359.
- Mussi, M. A., Limansky, A. S., & Viale, A. M. (2005). Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(4):1432-1440.
- Nastro M., Monge R., Zintgraff J., Vaulet L.G., Boutureira M., Famiglietti A., Rodriguez C.H. (2013). First nosocomial outbreak of VIM-16-producing *Serratia marcescens* in Argentina. *Clin Microbiol Infect.* 19(7):617-619.
- Nemec A., Musilek M., Sedo O., De Baere T., Maixnerova M., van der Reijden T.J., et al. (2010). *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60(4):896-903.
- Nicolas E., Lambin M., Dandoy D., Galloy C., Nguyen N., Oger C.A., Hallet B. (2014). The Tn3-family of replicative transposons. *Microbiol Spectrum* 3(4):MDNA3-0060-2014.

- Nicolau C. J., Oliver A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 28(1):19-28.
- Nicoletti, A. G., Marcondes, M. F., Martins, W. M., Almeida, L. G., Nicolás, M. F., Vasconcelos, A. T., Oliveira, V., Gales, A. C. (2015). Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.*, 59(9):5159-64.
- Nordmann P., Dortet L., Poirel L. (2012). Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med.*, 18:263-272.
- Nordmann P. and Poirel L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect*, 20:821-830.
- Norman A., Hansen L.H. and Sørensen S.J. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 364:2275-2289.
- Ocampo-Sosa A.A., Guzmán-Gómez L.P., Fernández-Martínez M., Román E., Rodríguez C., Marco F., Vila J., Martínez-Martínez L. (2015). Isolation of VIM-2-producing *Pseudomonas monteilii* clinical strains disseminated in a tertiary hospital in northern Spain. *Antimicrob Agents Chemother.*, 59:1334-1336.
- Ochman H., Gerber A.S., & Hartl D.L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 120(3):621-3.
- Oliver A. (2009). Impacto de la diseminación de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo- β -lactamasas en los hospitales: presente y futuro. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 27:255-256.
- Onmus-Leone F., Hang J., Clifford R.J., Yang Y., Riley M.C., et al. (2013). Enhanced de novo assembly of high throughput pyrosequencing data using whole genome mapping. *PloS one*, 8(4), e61762. doi:10.1371/journal.pone.0061762
- Osborn, A.M, Böltner, D. (2002). When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. *Plasmid*. 48(3):202-12.
- Ou, H. Y., Kuang, S. N., He, X., Molgora, B. M., Ewing, P. J., Deng, Z., Osby, M., et al. (2015). Complete genome sequence of hypervirulent and outbreak-associated *Acinetobacter baumannii* strain LAC-4: epidemiology, resistance genetic determinants and potential virulence factors. *Scientific reports*, 5:8643.
- Pagani L., Colinon C., Migliavacca R., Labonia M., Docquier J.D., Nucleo E., Spalla M., Bergoli L.M., and Rossolini G.M. (2005). Nosocomial Outbreak Caused by Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing IMP-13 Metallo- β -Lactamase. *J. Clin. Microbiol.*, 43:3824-3828.
- Pagniez G., Radice M., Cuirolo A., Rodriguez O., Rodriguez H., Vay C., et al. (2006). Prevalence of metallo-beta-lactamase in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* at a university hospital of Buenos Aires City. *Rev Argent Microbiol.*, 38: 33-7.
- Partridge S.R., Tsafnat G., Coiera E., Iredell J.R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.*, 33:757-784.
- Partridge, S. R. (2011). Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:820-855.
- Partridge S.R., Kwong S.M., Firth N., Jensen S.O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 31:e00088-17.
- Pasteran F., Faccone D., Petroni A., Rapoport M., Galas M., Vazquez M., and Procopio A. (2005). Novel variant (*bla*_{VIM-11}) of the metallo- β -lactamase *bla*_{VIM} family in a GES-1 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.*, 49: 474-475.
- Pasteran F., Veliz O., Faccone D., Guerriero L., Rapoport M., Mendez T. and Corso A. (2011). A simple test for the detection of KPC and metallo- β -lactamase carbapenemase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin. Microbiol. Infect.*, 17(9):1438-1441.

- Pasteran, F., Meo, A., Gómez S.A., Derdoy, L., Alborno E. et al. (2014). Emergence of genetically related NDM-1-producing *Providencia rettgeri* strains in Argentina. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4):344-345.
- Patel G., Bonomo R. (2013). "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol.*, 14(4):48.
- Patzer J.A., Walsh T.R., Weeks J., Danuta D. and Toleman M.A. (2009). Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998–2006. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63:269-273.
- Peix A., Ramírez-Bahena M.-H., Velázquez E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: an update. *Infect. Genet. Evol.* 57:106-116. doi10.1016/j.meegid.2017.10.026.
- Peleg A.Y., Seifert H., and Paterson D. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen *Clin. Microbiol. Rev.*, 21:538-582.
- Peleg, A. Y., & Hooper, D. C. (2010). Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England journal of medicine*, 362(19):1804-13.
- Pellegrini C., Mercuri P.S, Celenza G., Galleni M., Segatore B., Sacchetti E., Volpe R., Amicosante G. and Perilli M. (2009). Identification of *bla*_{IMP-22} in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. *J. Antimicrob.Chemother.*, 63:901-908.
- Perez F., Hujer A. M., Marshall S. H., Ray A. J., Rather P. N., Suwantarat N., Dumford D., O'Shea P., Domitrovic T. N., Salata R. A., et al. (2014). Extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates containing *bla*_{VIM-2} and elements of *Salmonella* genomic island 2: a new genetic resistance determinant in Northeast Ohio. *Antimicrob Agents Chemother.*, 58:5929-5935.
- Peter S., Oberhettinger P., Schuele L., Dinkelacker A., Vogel W., Dörfel D., Bezdan D., et al. (2017). Genomic characterisation of clinical and environmental *Pseudomonas putida* group strains and determination of their role in the transfer of antimicrobial resistance genes to *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC genomics*, 18(1):859.
- Petrovski S., and Stanisich V.A. (2010). Tn502 and Tn512 are *res* site hunters that provide evidence of resolvase-independent transposition to random sites. *J Bacteriol.*, 192:1865-1874.
- Pfaller M.A., Huband M.D., Mendes R.E., Flamm R.K., Castanheira M. (2018). In vitro activity of meropenem-vaborbactam and characterization of carbapenem resistance mechanisms among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from the 2015 meropenem-vaborbactam surveillance program. *Int J Antimicrob Agents pii S0924-8579(18):30064–30065*.
- Pfeifer, Y., Wilharm, G., Zander, E., Wichelhaus, T. A., Göttig, S., Hunfeld, K.-P., et al. (2011). Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J. Antimicrob. Chemother.*, 66:1998-2001.
- Poirel, L., Decousser, J. W. and Nordmann, P. (2003). Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a *bla*_{CTX-M} β -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.*, 47:2938-2945.
- Poirel L., Cabanne L., Collet L., and Nordmann P. (2006) Class II Transposon-Borne Structure Harboring Metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{VIM-2} in *Pseudomonas putida*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50:2889-2891.
- Poirel L., Naas T., and Nordmann P. (2010a). Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54:24-38.
- Poirel L., Rodríguez-Martínez J.M, Al Naiemi N., Debets-Ossenkopp Y.J, and Nordmann P. (2010b). Characterization of DIM-1, an Integron-Encoded Metallo- β -Lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* Clinical Isolate in the Netherlands. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54:2420-2424.

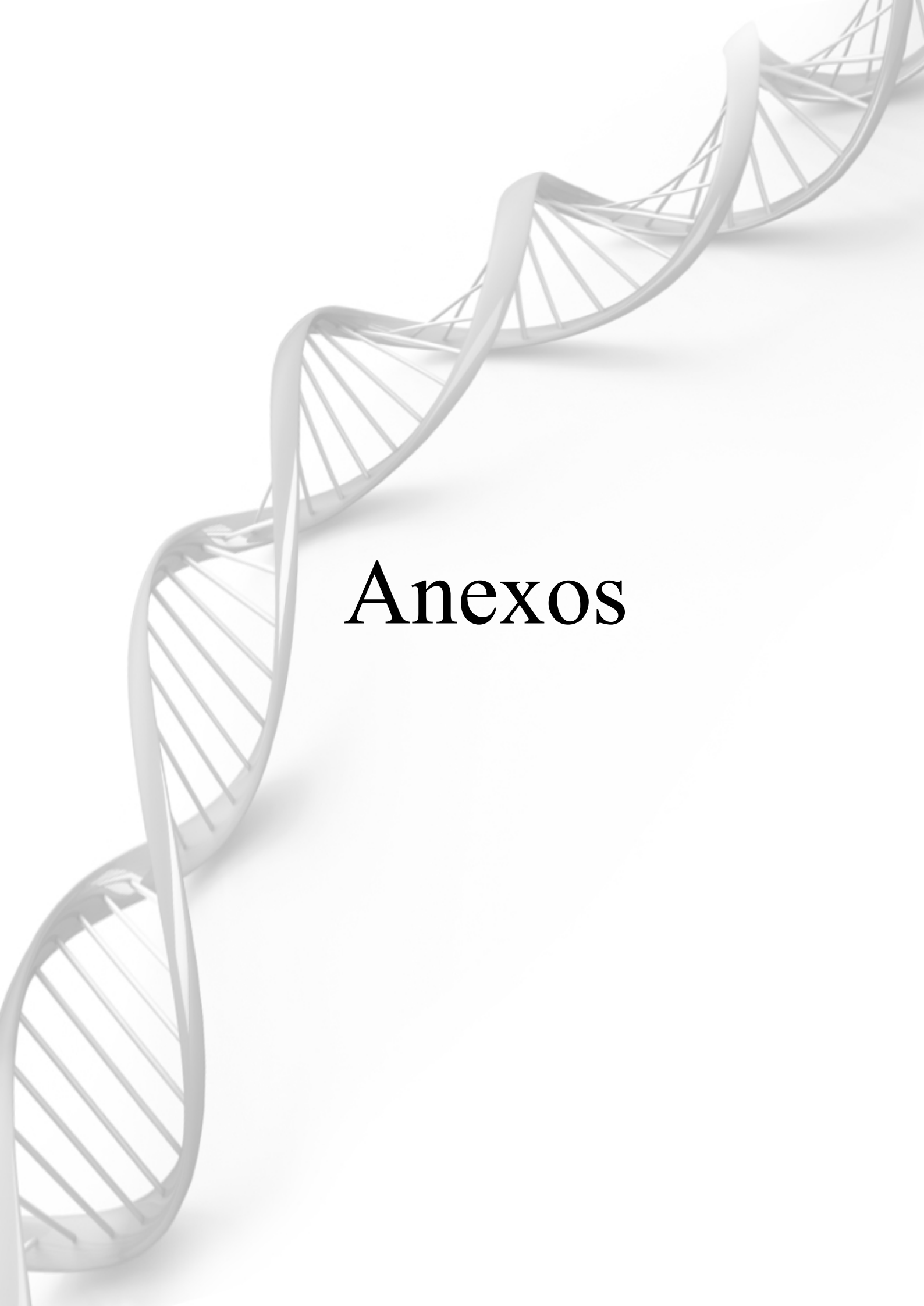
- Poirel, L., Bonnin, R. A., Boulanger, A., Schrenzel, J., Kaase, M., & Nordmann, P. (2012). Tn125-related acquisition of *bla*_{NDM}-like genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(2):1087-9.
- Pollini S., Maradei S., Pecile P. Olivo G., Luzzaro F., Docquier J.D., Rossolini G.M. (2013). FIM-1, a new acquired metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57(1):410-416.
- Post V., Recchia G.D., Hall R.M. (2007). Detection of gene cassettes in Tn402-like Class 1 integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51:3467-3468.
- Post V., & Hall R. M. (2009). AbaR5, a large multiple-antibiotic resistance region found in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6):2667-2671.
- Queenan A. M., and Bush K. (2007). Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin. Microb. Rev.*, 20:440-458.
- Quinones-Falconi, F, M. Galicia-Velasco, P. Marchiaro, M.A. Mussi, V. Ballerini, A.J. Vila, A.M. Viale, K. Bermejo-Morales, A.S. Limansky (2010). Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo- β -lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(2):126-131.
- Quinteira S., Ferreira H., Peixe L. (2005). First isolation of *bla*_{VIM-2} in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49:2140–1.
- Quinteira S., y Peixe L. (2006). Multiniche screening reveals the clinically relevant metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* far from the hospital setting: an ongoing dispersion process? *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:3743-3745.
- Radice M., Gutkind G. (2007). Resistencia a carbapenemes por metalo- β -lactamasas. *Revista FABICIB*, 11:163-173.
- Radström P., Sköld O., Swedberg G., Flensburg J., Roy P.H., Sundstrom L. (1994). Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol* 176:3257-3268.
- Rajewska, M., Wegrzyn, K., and Konieczny, I. (2012). AT-rich region and repeated sequences – the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol. Rev.*, 36:408-434.
- Rasmussen J. W. and Høiby N. (2006). Oxa-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:373-383.
- Rasmussen J. W. and Høiby N. (2007). Class A carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 60:470-482.
- Ravasi P., Limansky A. S., Rodriguez R. E., Viale A. M., and Mussi M. A. (2011). IS_{Aba825}, a Functional Insertion Sequence Modulating Genomic Plasticity and *bla*_{OXA-58}. Expression in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55:917-920.
- Roberts A.P., Chandler M., Courvalin P., Guedon G., Mullany P., Pembroke T., et al. (2008). Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid*, 60(3):167-173.
- Robledo I.E., Aquino E.E, Sante M.I., Santana J.L., Otero D.M, León C.F.and Vázquez G.J (2010). Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54:1354-1357.
- Rocca M.F., Prieto M., Almuzara M., Barberis C., Vay C. (2018). Manual de interpretación de resultados de MALDI-TOF (Bruker Daltonics).
- Rossolini G.M., Mantengoli E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 11(4):17-32.
- Saier M.H., Reddy V.S., Tsu B.V., Ahmed M.S., Li C., and Moreno-Hagelsieb G. (2016). The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances. *Nucleic Acids Res.*, 44(1):372-379.
- Sajjad A., Holley M.P., Labbate M., Stokes H.W., and Gillings M.R. (2011). A preclinical class 1 integron with a complete Tn402-like transposition module. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77:335-337.
- Salabi A.E., Toleman M.A., Weeks J., Bruderer T., Frei R., Walsh T.R. (2010). First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54:582.

- Salto, I.P., Torres Tejerizo, G., Wibberg, D., Puhler, A., Schluter, A., and Pistorio, M. (2018). Comparative genomic analysis of *Acinetobacter* spp. plasmids originating from clinical settings and environmental habitats. *Scientific Reports*, 8(1):7783.
- Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Samuelsen Ø., Buarø L., Toleman M.A., Giske C.G., Hermansen N.O., Walsh T.R. (2009). The First Metallo- β -Lactamase Identified in Norway Is Associated with a TnIC-Like Transposon in a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate of Sequence Type 233 Imported from Ghana. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53:331-332.
- Santella G., Pollini S., Docquier J. D., et al. (2010). Intercontinental dissemination of IMP-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* belonging in sequence type 621. *J Clin Microbiol*, 48:4342-4343.
- Santos C., Caetano T., Ferreira S., Mendo S. (2010). Tn5090-like class 1 integron carrying *bla_{VIM-2}* in a *Pseudomonas putida* strain from Portugal. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16:1555-1567.
- Schmieder R. y Edwards R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol.*, 7(1):73-89.
- Scotta C., Juan C., Cabot G., Oliver A., Lalucat J., Bennisar A., and Alberti S. (2011). Environmental Microbiota Represents a Natural Reservoir for Dissemination of Clinically Relevant Metallo- β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54:5376-5379.
- Sekiguchi J., Morita K., Kitao T., Watanabe N., Okazaki M., Miyoshi-Akimaya T., Kanamori M. and Kirikae T. (2008). KHM-1, a novel plasmid mediated metallo- β -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.*, 52:4194-97.
- Sekizuka T., Matsui M., Yamane K., Takeuchi F., Ohnishi M., Hishinuma A., Arakawa Y., Kuroda M. (2011). Complete sequencing of the *bla_{NDM-1}*-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS One* 6:e25334.
- Sevin E.W., and Barloy-Hubler F. (2007). RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biol* 8(8):155.
- Shahcheraghi F., Abbasalipour M., Feizabadi M.M., Ebrahimipour G.H., Akbari N. (2011). Isolation and genetic characterization of metallo- β -lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iran J. Microbiol.*, 3(2):68-74.
- Shapiro J.A., and Sporn P. (1977). Tn402: a new transposable element determining trimethoprim resistance that inserts in bacteriophage lambda. *J. Bacteriol.*, 129:1632-1635.
- Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology*, 6:242.
- Siguier P., Perochon J., Lestrade L., Mahillon J., and Chandler M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.*, 34:32-36.
- Slater F.S., Bailey M.J., Tett A.J., Turner S. (2008). Progress towards understanding the fate of plasmids in bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol.*, 66(1): 3-13.
- Smillie C., Garcillán-Barcia P., Francia M.V., Rocha E., de la Cruz F. (2010). Mobility of Plasmids. *Microb. Mol. Biology. Rev.*, 74:434-52.
- Snyder L. y Champness W. (2007). *Molecular Genetics of Bacteria*. Third Edition. ASM Press. 2007.
- Stachyra, T., Levasseur, P., Péchereau, M. C., Girard, A. M., Claudon, M., Miossec, C., & Black, M. T. (2009). In vitro activity of the β -lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenamase and Enterobacteriaceae expressing KPC carbapenemases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 64(2):326-9.
- Stokes H.W., Nesbo C.L., Holley M., Bahl M.I., Gillings M.R. and Boucher Y. (2006). Class 1 integrons potentially predating the association with Tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *J. Bacteriol.*, 188:5722-5730.

- Stokes H.W., Elbourne L.D., & Hall, R.M. (2007). Tn1403, a multiple-antibiotic resistance transposon made up of three distinct transposons. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(5):1827-9.
- Stone N., Woodford N., Livermore D., Howard J., Pike R., Mushtaq S., Perry C. and Hopkins S. (2011). Breakthrough bacteraemia due to tigecycline-resistant *Escherichia coli* with New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-1 successfully treated with colistin in a patient with calciphylaxis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 66:2677-2678.
- Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964.
- Summers D.K., Sherratt DJ. (1988). Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site. *EMBO J.*, 7(3):851-8.
- Summers D.K., Beton C.W., Withers H.L. (1993). Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Molecular microbiology*, 8(6):1031-8.
- Suzuki H., Yano H., Brown C.J., and Top E.M. (2010). Predicting Plasmid Promiscuity Based on Genomic Signature. *J. Bacteriol.*, 192:6045-6055.
- Sun, Y., Song, Y., Song, H., Liu, J., Wang, P., Qiu, S., Chen, S., Zhu, L., Ji, X., Wang, Z., et al. (2013). Complete Genome Sequence of an *Acinetobacter* Strain Harboring the NDM-1 Gene. *Genome announcements*, 1(2), e0002312.
- Sun F., Zhou D., Wang Q., Feng J., Feng W., Luo W., Liu Y., Qiu X., Yin Z., Xia P. (2015). Genetic characterization of a novel *bla*_{DIM-2}-carrying megaplasmid p12969-DIM from clinical *Pseudomonas putida*. *J Antimicrob Chemother.*, 71:909-12.
- Sun F., Zhou D., Wang Q., Feng J., Feng W., Luo W., Zhang D., Liu Y., Qiu X., Yin Z., Chen W., Xia P., (2016). The first report of detecting the *bla*_{SIM-2} gene and determining the complete sequence of SIM-encoding plasmid. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(4):347-351.
- Tada T., Shimada K., Satou K., Hirano T., Pokhrel B.M., Sherchand J.B., Kirikae T. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Nepal coproducing metallo- β -lactamases and 16S rRNA methyltransferases. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00694-17.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: 1063 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.*, 30(12):2725-2729.
- Tato M., Coque T.M., Baquero F. y Cantón R. (2010). Dispersal of carbapenemase *bla*_{VIM-1} gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54:320-327.
- Tavakoli N., Comanducci A., Dodd H.M., Lett M.C., Albiger B., Bennett P. (2000). IS1294, a DNA element that transposes by RC transposition. *Plasmid* 44:66-84.
- Tennstedt T., Szczepanowski R., Krahn I., Puhler A., Schluter A. (2005). Sequence of the 68,869 bp IncP-1 α plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid*, 53:218-38.
- Timperio, A. M., Gorrasi, S., Zolla, L., & Fenice, M. (2017). Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water. *PloS one*, 12(7), e0181860.
- Toleman M.A., Simm A. M., Murphy T.A., Gales A.C., Biedenbach D.J., Jones R. N., and Walsh T.R. (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50:673-679.
- Toleman M.A., Biedenbach D., Bennett D., Jones R.N., and Timothy R. Walsh T.R. (2003). Genetic characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP-13}, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob.Chemother.*, 52:583-590.
- Toleman M.A., Bennett P.M., and Walsh T.R. (2006). ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70: 296–316.

- Toleman M.A., Vinodh H., Sekar U., Kamat V., Walsh T.R. (2007). *bla_{VIM-2}*-harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51:2636-2638.
- Toleman, M. A., Spencer, J., Jones, L., & Walsh, T. R. (2012). *bla_{NDM-1}* is a chimera likely constructed in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(5):2773-2776.
- Toussaint, A., Merlin C. (2002). Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid*. 47(1):26-35.
- Trevors J.T. (1986). Plasmid curing in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 32:149-157.
- Van Melder L., Saavedra De Bast M. (2009). Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities? *PLoS Genet* 5(3): e1000437.
- Vaneechoutte, M., Young, D.M., Ornston, L.N., De Baere, T., Nemec, A., Van Der Reijden, T., Carr, E., Tjernberg, I., Dijkshoorn, L. (2006). Naturally transformable *Acinetobacter* sp. strain ADP1 belongs to the newly described species *Acinetobacter baylyi*. *Appl Environ Microbiol.*, 72:932-36.
- Vaneechoutte M., Dijkshoorn L., Nemec A., Kampf P. & Wauters G. (2011). *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In *Manual of Clinical Microbiology*, 10:714-738.
- van Hoek A. H., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. P., & Aarts H. J. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology*, 28(2):203.
- Ventola C.L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, 40(4):277-83.
- Vila J., Martí S. and Sánchez-Céspedes J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* J. *Antimicrob.Chemother.*, 59:1210-1215.
- Vilacoba, E., Quiroga, C., Pistorio, M., Famiglietti, A., Rodríguez, H., Kovensky, J., Déraspe, M., et al. (2014). A *bla_{VIM-2}* plasmid disseminating in extensively drug-resistant clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.*, 58(11):7017-7018.
- Villa L., Poirel L., Nordmann P., Carta C., Carattoli A. (2012). Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the *bla_{NDM-1}*, *bla_{CTX-M-15}* and *qnrB1* genes. *J Antimicrob Chemother.*, 67:1645-1650.
- Wachino J., Yoshida H., Yamane K., Suzuki S, Matsui M., Yamagishi T, Tsutsui A., Konda T, Shibayama K., and Arakawa Y. (2011) SMB-1, a Novel Subclass B3 Metallo-β-Lactamase, Associated with *ISCR1* and a Class 1 Integron, from a Carbapenem-Resistant *Serratia marcescens* Clinical Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55(11):5143–5149.
- Walsh T. R., Toleman M. A., Poirel L., and Nordmann P. (2005). Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.*, 18:306-325.
- Wang X., Zhang Z., Hao Q., Wu J., Xiao J., & Jing, H. (2014). Complete Genome Sequence of *Acinetobacter baumannii* ZW85-1. *Genome announcements*, 2(1), e01083-13.
- Wendel A.F., MacKenzie C.R. (2015). Characterization of a novel metallo-β-lactamase variant, GIM-2, from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother*, 59:1824-1825.
- Wong D., Nielsen T.B., Bonomo R.A., Pantapalangkoor P., Luna B., & Spellberg B. (2016). Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clinical microbiology reviews*, 30(1):409-447.
- Wright G.D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity Gerard D. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5:175-86.
- Wu W., Feng Y., Tang G., Qiao F., McNally A., Zong Z. (2019). NDM metallo-β-lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clin Microbiol Rev* 32:e00115-18.
- Xie Y., Wei Y., Shen Y., Li X., Zhou H., Tai C., et al. (2018). TADB 2.0: an updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci. *Nucleic Acids Res* 46(1):749-753.
- Xiong J., Déraspe M., Iqbal N., Ma J., Jamieson F.B., Wasserscheid J., Dewar K., Hawkey P.M., Roy P.H. (2016). Genome and plasmid analysis of *bla_{IMP-4}*-carrying *Citrobacter freundii* B38. *Antimicrob Agents Chemother.*, 60:6719-6725. doi:10.1128/AAC.00588-16.

- Yamamoto M, Nagao M, Matsumura Y et al. (2013). Regional dissemination of *Acinetobacter* species harbouring metallo- β -lactamase genes in Japan. Clin. Microbiol. Infect. 19(8):729-736.
- Yang J, Chen Y, Jia X, Luo Y, Song Q, Zhao W, Wang Y, Liu H, Zheng et al. (2012). Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. Clin. Microbiol. Infect. 18:506-513.
- Yong D., Toleman M.A., Giske C.G., Cho H.S., Sundman K., Lee K., and Walsh T. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob. Agents Chemother., 53:5046-54.
- Yong, D., Toleman, M. A., Bell, J., Ritchie, B., Pratt, R., Ryley, H., & Walsh, T. R. (2012). Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo- β -lactamase gene, *bla*_{AIM-1}, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. Antimicrobial agents and chemotherapy, 56(12):6154-9.
- Yong D., Bell J.M., Ritchie B., Pratt R., Toleman M.A., Walsh T.R. A novel sub-group metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. 47th Interscience Conference on Antimicrob. Agents Chemother; Chicago, USA; Sept 17–20, 2007.
- Yoon E.J., Goussard S., Touchon M., Krizova L., Cerqueira G., Murphy C., Lambert T., Grillot-Courvalin C., Nemec A., Courvalin, P. (2014). Origin in *Acinetobacter guillouiae* and dissemination of the aminoglycoside-modifying enzyme Aph(3')-VI. mBio, 5(5), e01972-14.
- Zamorano, L., Mulet, X., Garau, M., Gallegos, C., Juan, C., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2016). VIM-47, a New Variant of the Autochthonous Metallo- β -Lactamase VIM-13 from the Balearic Islands in Spain. Antimicrobial agents and chemotherapy, 60(5):3251-3252.
- Zhang W.J., Lu Z., Schwarz S., Zhang R., et al. (2013) Complete sequence of the *bla*_{NDM-1} carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 68(7):1681-1682.
- Zhang R, Hu YY, Yang XF, Gu DX, Zhou HW, Hu QF, Zhao K, Yu SF, Chen GX. (2014). Emergence of NDM-producing non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. isolated from China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 33:853-860.
- Zhang F., Wang X., Xie L., Zheng Q., Guo X., Han L., et al. (2017a). A novel transposon, Tn6306, mediates the spread of *bla*_{IMI} in *Enterobacteriaceae* in hospitals. Int J Infect Dis., 65:22-26.
- Zhang R., Liu Z., Li J., Lei L., Yin W., Li M., Wu C., Walsh T.R., Wang Y., Wang S., Wu Y. (2017b). Presence of VIM-positive *Pseudomonas* species in chickens and their surrounding environment. Antimicrob Agents Chemother., 61:e00167-17.
- Zhao W.H., Hu Z.Q. (2011a). IMP-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. Crit. Rev. Microbiol., 37:214-226
- Zhao W.H., Hu Z.Q. (2011b). Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. Future Microbiol., 6:317-333
- Zhao, W. H., and Hu, Z. Q. (2012). *Acinetobacter*: a potential reservoir and dispenser for β -lactamases. Crit. Rev. Microbiol. 38:30-51.
- Zhao, W.H., and Hu, Z.Q. (2015). Acquired metallo-beta-lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. Future Microbiol. 10, 873-887.
- Zhou, S., Chen, X., Meng, X., Zhang, G., Wang, J., Zhou, D., & Guo, X. (2015). "Roar" of *bla*_{NDM-1} and "silence" of *bla*_{OXA-58} co-exist in *Acinetobacter pittii*. Scientific reports, 5:8976.
- Zong, Z., and Zhang, X. (2013). *bla*_{NDM-1}-carrying *Acinetobacter johnsonii* detected in hospital sewage. J. Antimicrob. Chemother., 68:1007-1010.
- Zou, D., Huang, Y., Liu, W., Yang, Z., Dong, D., Huang, S., He, X., et al. (2017). Complete sequences of two novel *bla*_{NDM-1}-harbouring plasmids from two *Acinetobacter towneri* isolates in China associated with the acquisition of Tn125. Scientific reports, 7(1):9405.



Anexos

Tabla A.1. Números de acceso de las secuencias parciales de los marcadores de *Pseudomonas* grupo *putida* empleadas para los análisis filogenéticos (ítem III.1.2.1)

Cepa	Número de acceso del NCBI (GenBank)		
	ARNr 16	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
<i>P. putida</i> BA9115	KY849566.1	KY849567.1	KY849568.1
<i>P. putida</i> BA7908	KY849572.1	KY849573.1	KY849574.1
<i>P. monteilii</i> HB157	KY810326.1	KY810327.1	KY810328.1
<i>P. monteilii</i> BA9713	KY849575.1	KY849576.1	KY849577.1
<i>P. grupo putida</i> /I HP813	KY810332.1	KY810333.1	KY810334.1
<i>P. grupo putida</i> /II LA1008	KY810341.1	KY810342.1	KY810343.1
<i>P. grupo putida</i> /II HE1012	KY810335.1	KY810336.1	KY810337.1
<i>P. grupo putida</i> /IV LD209	KY810338.1	KY810339.1	KY810340.1
<i>P. grupo putida</i> /IV BA7816	KY849578.1	KY849579.1	KY849580.1
<i>P. grupo putida</i> /V BA9605	KY849569.1	KY849570.1	KY849571.1
<i>P. grupo putida</i> /VII LA111	KY810329.1	KY810330.1	KY810331.1

Tabla A.2. Genes codificantes del plásmido pNDM229

Orden	Gen/ORF	Localización (nucleótidos)		Hebra de ADN	Proteínas con mayor similitud de secuencia en la base de datos de NCBI (BlastP)			
		Inicio	Final		Función asignada	Origen (microorganismo y/o plásmido)	Proteína más relacionada	Longitud (aminoácidos)
1	<i>traA</i>	196	3.186	+	Relaxasa TraA	<i>Acinetobacter</i> spp.	100% (WP_015060701)	996
2	<i>orf2</i>	3.201	4.445	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	100% (WP_015060702)	414
3	<i>orf3</i>	4.456	4.908	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	100% (WP_004993232)	150
4	<i>orf4</i>	5.311	4.970	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	100% (WP_019768104)	113
5	<i>orfA</i>	5.503	5.820	+	Primera parte de la transposasa de IS <i>Aba14</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	100% (WP_001986695.1)	105
6	<i>orfB</i>	5.955	6.647	+	Segunda parte de la transposasa de IS <i>Aba14</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	100% (WP_001199914.1)	230
7	<i>aphA6</i>	6.753	7.532	+	Aminoglicósido 3'-fosfotransferasa Apha6	<i>Acinetobacter</i> spp.	100% (WP_014386410.1)	259
8	<i>tnpA</i>	7.684	8.709	+	Transposasa de IS <i>Aba125</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	100% (WP_004994718.1)	341
9	<i>bla_{NDM-1}</i>	8.810	9.622	+	Metallo-β-lactamasa NDM-1	<i>Acinetobacter</i> spp.	100% (WP_004201164)	270

10	<i>ble</i>	9.626	9.991	+	Proteína vinculada a la resistencia de bleomicina	<i>Acinetobacter</i> spp.	121	100% (WP_004201167.1)
11	$\Delta trpF$	9.996	10.634	+	Fosforribosil antranilato isomerasa, truncada	<i>Acinetobacter</i> spp.	212	100% (WP_004201168.1)
12	<i>dsbC</i>	11.676	10.645	-	Isomerasa de puentes disulfuro	<i>Acinetobacter</i> spp.	343	100% (WP_004201169.1)
13	<i>cutA1</i>	12.088	11.681	-	Proteína involucrada en tolerancia celular de cationes divalentes	<i>Acinetobacter</i> spp.	135	100% (WP_014386478.1)
14	$\Delta groES$	12.204	12.494	+	Chaperona GroES, truncada	<i>Acinetobacter</i> spp.	96	100% (WP_015058986.1)
15	<i>groEL</i>	12.550	14.190	+	Chaperona GroEL, truncada	<i>Acinetobacter</i> spp.	546	100% (WP_004201176.1)
16	<i>insE</i>	14.379	15.908	+	Transposasa de ISCR21	<i>Acinetobacter</i> spp.	509	100% (WP_015056392.1)
17	Δpac	16.403	16.119	-	Acetiltransferasa, truncada	<i>Acinetobacter</i> spp.	94	100% (WP_015056391)
18	<i>tnpA</i>	16.696	17.721	+	Transposasa de ISAbal25	<i>Acinetobacter</i> spp.	341	100%(WP_001988464.1)
19	<i>orfA</i>	18.282	18.599	+	Primera parte de la transposasa tipo-ISAbal14	<i>Acinetobacter</i> spp.	105	100% (WP_001986695.1)
20	<i>orfB</i>	18.734	19.426	+	Segunda parte de la transposasa tipo-ISAbal14	<i>Acinetobacter</i> spp.	230	100% (WP_002062188.1)
21	<i>tnpR</i>	20.269	19.622	-	Resolvasa de la familia serín-recombinasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	215	100% (WP_015056390.1)
22	<i>orf22</i>	20.421	20.645	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	74	100% (WP_015056389.1)
23	<i>zeta toxin</i>	20.829	22.541	+	Toxina Zeta del sistema TA tipo II	<i>Acinetobacter</i> spp.	570	100% (WP_015060705.1)
24	<i>parB</i>	23.020	22.538	-	Proteínas vinculada a la partición ParB	<i>Acinetobacter</i> spp.	160	100% (WP_015060706)
25	<i>orf25</i>	23.681	23.220	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	153	100% (WP_015060707.1)
26	<i>virB5</i>	24.385	23.744	-	Proteína VirB5 del SST4	<i>Acinetobacter</i> spp.	213	100% (WP_004999358.1)
27	<i>virB4</i>	27.093	24.382	-	Proteína VirB4 del SST4	<i>Acinetobacter</i> spp.	903	100% (WP_015060708.1)
28	<i>virB2</i>	27.398	27.105	-	Proteína VirB2 del SST4	<i>Acinetobacter</i> spp.	97	100% (WP_017480461.1)
29	<i>virB1</i>	28.125	27.409	-	Proteína VirB1 del SST4	<i>Acinetobacter</i> spp.	238	100% (WP_015060709.1)

30	orf30	28.364	28.164	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	66	100% (WP_004999346.1)
31	orf31	30.059	28.383	-	Proteína hipotética de fusión de 117 AA del N-terminal de transglicosidasa y 441 AA del C-terminal de VirD4	<i>Acinetobacter</i> spp.	558	100% 117 aa del N-terminal (WP_015060711.1)/100% 440 aa C-terminal (WP_015060710.1)
32	orf32	30.587	30.135	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	150	100% (WP_004999340.1)
33	orf33	30.965	30.591	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	124	100% (WP_015060712.1)
34	$\Delta virB11$	31.293	30.889	-	Proteína VirB11 del SST4, truncada	<i>Acinetobacter</i> spp.	134	100% (WP_015060713.1)
35	$\Delta virB8$	31.954	31.301	-	Proteína VirB8 del SST4, truncada	<i>Acinetobacter</i> spp.	217	99% (WP_005000436.1)
36	<i>virB6</i>	33.039	31.954	-	Proteína VirB6 del SST4	<i>Acinetobacter</i> spp.	361	100% (WP_005000437)
37	orf37	33.484	33.047	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	145	100% (WP_015060714.1)
38	orf38	33.824	33.453	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	123	100% (WP_005000442.1)
39	orf39	34.021	33.821	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	66	100% (WP_017480464.1)
40	orf40	35.685	35.446	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	79	100% (WP_005000443.1)
41	<i>parA</i>	35.702	36.391	+	Proteína ParA vinculada a la partición	<i>Acinetobacter</i> spp.	229	100% (WP_005000446.1)
42	orf42	36.388	36.792	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	134	100% (WP_005000449.1)
43	orf43	36.802	36.990	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	62	100% (WP_005000454.1)
44	orf44	38.461	37.433	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	342	100% (WP_005000195.1)
45	orf45	38.849	39.154	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	101	100% (WP_005000193.1)
46	orf46	39.380	39.775	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	131	100% (WP_005000189)
47	orf47	40.038	40.679	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	213	100% (WP_015060715.1)
48	orf48	40.910	41.383	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	157	100% (WP_015060716.1)
49	<i>traC</i>	41.617	42.444	+	Primasa TraC	<i>Acinetobacter</i> spp.	275	100% (WP_015060717.1)
50	orf50	42.506	42.742	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	78	100% (WP_015060718.1)
51	orf51	42.903	43.325	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	140	100% (WP_015060719.1)
52	orf52	43.312	43.542	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	76	100% (WP_017480467.1)
53	<i>traD</i>	44.302	43.766	-	Proteína TraD del sistema de transferencia plasmídica	<i>Acinetobacter</i> spp.	178	100% (WP_015060720.1)

^aEl algoritmo BlastP se utilizó para buscar similitudes de proteínas en las bases de datos del NCBI (GenBank). El número de acceso de la proteína de mayor identidad aminoacídica se indica entre paréntesis.

Tabla A.3. Genes codificantes del plásmido pAbe229-114

Orden	Gen/ORF	Localización (nucleótidos)		Hebra de ADN	Proteínas con mayor similitud de secuencia en la base de datos de NCBI (según BlastP)			
		Inicio	Final		Función asignada	Origen (microorganismo y/o plásmido)	Proteína más relacionada	
							Longitud (aminoácidos)	Identidad aminoacídica ^a (número de acceso)
1	<i>repB</i>	354	1.526	+	Proteína implicada en la replicación plasmídica	<i>A. ursingii</i> UMB1319, <i>A. nosocomialis</i> 2010S01-197	390	100% (WP_043972782.1)
2	<i>orf2</i>	2.643	1.795	-	Proteína hipotética	<i>A. ursingii</i> UMB1319	282	100% (PMC95989.1)
3	<i>orf3</i>	2.745	2.924	+	Proteína hipotética	<i>A. ursingii</i> UMB1319	59	100% (PMC95988.1)
4	<i>orf4</i>	3.213	4.361	+	Proteína hipotética	<i>A. ursingii</i> UMB1319	382	100% (PMC95987.1)
5	<i>tnpA</i>	5.302	4.373	-	Transposasa	<i>A. ursingii</i> UMB1319	309	100% (PMC95986.1)
6	<i>orf6</i>	5.331	5.507	+	Proteína hipotética	<i>A. johnsonii</i> S2_018_000_R3_109	57	93% (PZO89185.1)
7	<i>orf7</i>	6.059	5.721	-	Proteína hipotética	<i>A. ursingii</i> UMB1319, <i>A. johnsonii</i> S2_018_000_R3_109	112	100% (WP_058971435.1)
8	<i>orf8</i>	6.882	6.55	-	Regulador transcripcional de la familia XRE	<i>A. ursingii</i> UMB1319, <i>A. johnsonii</i> S2_018_000_R3_109	110	100% (WP_058971433.1)
9	<i>ΔtnpA</i>	6.914	7.255	+	Transposasa truncada	<i>A. baumannii</i> WC-A-92	124	99% (ELW85486.1)
10	<i>cadR</i> -like	8.270	7.878	-	Regulador transcripcional tipo-CadR	<i>Acinetobacter</i> spp.	130	100% (WP_004281856.1)
11	<i>cadA</i> -like	8.349	9.641	+	Proteína implicada en la resistencia a cobalto-zinc-cadmio	<i>A. radioresistens</i> SH164	430	99% (EEY85464.1)
12	<i>feoA</i>	9.653	9.91	+	Proteína asociada al transporte de hierro FeoA	<i>A. johnsonii</i> XBB1	85	100% (ALV71632.1)
13	<i>feoB</i>	9.900	11.729	+	Transportador de hierro FeoB	<i>A. johnsonii</i> XBB1	609	99% (ALV71631.1)
14	<i>acr3</i>	12.808	11.852	-	Proteína involucrada en la resistencia a Arsénico Acr3	<i>Acinetobacter</i> spp.	318	99% (WP_004665958.1)
15	<i>orfA</i>	12.895	13.257	+	Primera parte de la transposasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	105	100% (WP_002045130.1)
16	<i>orfB</i>	13.257	14.174	+	Segunda parte de la transposasa	<i>A. indicus</i> IHIT33295	321	97% (WP_104495087.1)
17	<i>cusF</i>	14.732	14.367	-	Proteína periplasmática CusF	<i>Acinetobacter</i> spp.	121	95% (WP_004726733.1)
18	<i>cusA</i>	17.912	14.766	-	Proteína de membrana CusA del sistema de eflujo de cobre/plata	<i>Acinetobacter</i> spp.	1.048	98% (WP_000561666.1)
19	<i>cusB</i>	19.425	17.926	-	Proteína de fusión de	<i>Acinetobacter</i> spp.	499	99% (WP_000945694.1)

					membrana CusB del sistema de eflujo de cobre/plata			
					Proteína de membrana externa			
20	<i>cusC</i>	20.444	19.425	-	CusC del sistema de eflujo de cobre/plata	<i>Acinetobacter</i> spp.	339	96% (WP_005079043.1)
21	<i>hipA</i>	22.343	21.078	-	Toxina HipA del sistema TA HipA/HipB	<i>Acinetobacter</i> spp.	421	100% (WP_000934717.1)
22	<i>hipB</i>	22.648	22.343	-	Antitoxina HipB del sistema TA HipA/HipB	<i>Acinetobacter</i> spp.	101	100% (WP_000366814.1)
23	<i>orf23</i>	23.825	23.568	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	85	100% (WP_004726728.1)
24	<i>fic</i>	24.771	24.175	-	Toxina Fic del sistema TA Fic/YhfG	<i>Acinetobacter</i> spp.	198	100% (WP_004826955.1)
25	<i>yhfG</i>	24.951	24.784	-	Antitoxina YhfG el sistema TA Fic/YhfG	<i>Acinetobacter</i> spp.	55	100% (WP_002125865.1)
26	<i>orf26</i>	25.706	28.045	+	Proteína hipotética	<i>A. ursingii</i> UMB1319	779	100% (PMC95142.1)
27	<i>int1</i>	28.050	31.250	+	Integrasa de la superfamilia de las tirosin-recombinasas	<i>Acinetobacter</i> spp.	1066	100% (WP_017396129.1)
28	<i>orf28</i>	31.796	31.578	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	72	100% (WP_004826949.1)
29	<i>umuC</i>	33.096	31.801	-	Polimerasa tipo V (UmuC)	<i>Acinetobacter</i> spp.	431	100% (WP_004826947.1)
30	<i>umuD</i>	33.737	33.111	-	Proteína UmuD implicada en la reparación	<i>Acinetobacter</i> spp.	208	100% (WP_004826946.1)
31	<i>yedK</i>	34.49	33.849	-	Peptidasa asociada a la respuesta SOS	<i>Acinetobacter</i> spp.	213	100% (WP_002046584.1)
32	<i>irrE</i>	35.843	34.737	-	Regulador transcripcional de la familia XRE	<i>Acinetobacter</i> spp.	368	100% (WP_000482094.1)
33	<i>orf33</i>	36.566	35.856	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	236	100% (WP_001052588.1)
34	<i>fadB</i>	37.591	39.744	+	Proteína implicada en la oxidación de ácidos grasos FadB	<i>A. ursingii</i> UMB1319	717	100% (PMC95251.1)
35	<i>fadA</i>	39.757	40.929	+	Proteína implicada en la oxidación de ácidos grasos FadA	<i>A. ursingii</i> UMB1319	390	100% (PMC95250.1)
36	<i>orf36</i>	42.332	41.79	-	Proteína hipotética	<i>A. lwoffii</i> ED23-35	180	100% (APW48797.1)
37	<i>yciW</i>	42.997	42.443	-	Alquilperoxidasa YciW	<i>Acinetobacter</i> spp.	184	99% (WP_043971153.1)
38	<i>orf38</i>	43.835	45.046	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	424	100% (WP_005006246.1)
39	<i>araC</i>	46.026	45.091	-	Regulador transcripcional de la familia AraC	<i>Acinetobacter</i> spp.	311	100% (WP_005006248.1)
40	<i>msrA</i>	46.239	46.637	+	Sulfóxido reductasa de S- metionina MsrA	<i>Acinetobacter</i> spp.	162	100% (WP_005006250.1)
41	<i>grxC-like</i>	46.665	46.901	+	Glutaredoxina	<i>Acinetobacter</i> spp.	78	100% (WP_005006251.1)

42	<i>selR</i>	46.933	47.373	+	Sulfóxido reductasa de R-metionina SelR	<i>Acinetobacter</i> spp.	146	100% (WP_005006253.1)
43	<i>msrA-like</i>	47.602	48.264	+	Sulfóxido reductasa de S-metioninas tipo-MsrA	<i>Acinetobacter</i> spp.	220	100% (WP_005028456.1)
44	<i>orf44</i>	49.423	48.452	-	Proteína hipotética	<i>A. ursingii</i> UMB1319	323	100% (PMC95242.1)
45	<i>orf45</i>	50.194	49.793	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	133	100% (WP_005028450.1)
46	<i>tnpA</i>	51.054	50.353	-	Transposasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	233	100% (WP_005005861.1)
47	<i>orf47</i>	51.580	52.293	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	237	100% (WP_001986287.1)
48	<i>int2</i>	52.687	53.886	+	Integrasa de la superfamilia de las tirosin-recombinasas	<i>Acinetobacter</i> spp.	399	100% (WP_000059658.1)
49	<i>hicB</i>	54.016	54.141	+	Antitoxina HicB del sistema TA HicA/HicB	<i>Acinetobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> sp. Ni15	73	100% (WP_001986288.1)
50	<i>nrpA</i>	54.654	54.394	-	Proteína vinculada a la resistencia de níquel NrpA Regulador transcripcional	<i>Acinetobacter</i> spp.	86	100% (WP_017396126.1)
51	<i>nrpB</i>	54.840	55.061	+	NrpB vinculada a la resistencia de níquel	<i>Acinetobacter</i> spp.	73	100% (WP_004658364.1)
52	<i>orfA</i>	55.472	55.708	+	Primera parte de la transposasa	<i>A. pittii</i> ANC 3678	78	100% (WP_080631238.1)
53	<i>orfB</i>	55.829	55.966	+	Segunda parte de la transposasa	<i>Acinetobacter</i> sp. 1289694	45	100% (EXA84446.1)
54	<i>cadR</i>	56.620	56.213	-	Regulador transcripcional CadR	<i>Acinetobacter</i> spp.	135	99% (WP_001219642.1)
55	<i>cadA</i>	56.716	57.612	+	Proteína implicada en la resistencia a cobalto-zinc-cadmio	<i>Acinetobacter</i> spp.	298	100% (WP_009392494.1)
56	Δ <i>lspA</i>	57.718	58.101	+	Lipoproteína truncada	<i>Acinetobacter</i> spp.	161	100% (WP_004827041.1)
57	<i>tnpA</i>	58.129	59.061	+	Transposasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	310	99% (WP_000743262.1)
58	<i>orf58</i>	59.261	59.590	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	109	99% (WP_004827037.1)
59	<i>orf59</i>	59.937	60.422	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	161	100% (WP_004827035.1)
60	<i>orf60</i>	60.379	61.593	+	Proteína hipotética	<i>A. bereziniae</i> NIPH 3	404	100% (ENV23844.1)
61	<i>orf61</i>	62.145	63.377	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	410	100% (WP_001255534.1)
62	<i>orf62</i>	63.978	63.649	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	109	100% (WP_000506885.1)
63	<i>yafY</i>	64.220	65.053	+	Proteína con dominio WYL	<i>Acinetobacter</i> spp.	288	100% (WP_004827030.1)
64	<i>brxA</i>	65.064	65.675	+	Proteína de membrana interna BrxA del sistema BREX-1	<i>Acinetobacter</i> spp.	203	100% (WP_000892996.1)
65	<i>brxB</i>	65.692	66.267	+	Proteína citoplasmática BrxB del sistema BREX-1	<i>Acinetobacter</i> spp.	201	100% (WP_004281985.1)

66	<i>brxC</i>	66.308	69.988	+	Proteína BrxC del sistema BREX-1	<i>Acinetobacter</i> spp.	1.226	98% (WP_001021842.1)
67	<i>pglX</i>	70.035	73.523	+	Metiltransferasa de ADN específica de adeninas PglX del sistema BREX-1	<i>A. ursingii</i> UMB1319	1.162	99% (PMC96553.1)
68	<i>pglZ</i>	73.567	76.191	+	Fosfatasa PglZ del sistema BREX-1	<i>Acinetobacter</i> spp.	874	98% (WP_005071458.1)
69	<i>brxL</i>	76.221	78.26	+	Protesa BrxL del sistema BREX-1	<i>Acinetobacter</i> spp.	679	100% (WP_004827020.1)
70	<i>ΔtnpA</i>	78.585	78.361	-	Transposasa trunca	<i>A. junii</i> SH205, <i>A. bereziniae</i> NIPH 3	74	100% (WP_004827017.1)
71	<i>orf71</i>	79.528	78.818	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	236	100% (WP_004827016.1)
72	<i>orf72</i>	80.232	79.51	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	240	100% (WP_004827012.1)
73	<i>marR</i>	80.876	80.229	-	Regulador transcripcional de la familia MarR	<i>Acinetobacter</i> spp.	215	100% (WP_004827010.1)
74	<i>higA2</i>	81.696	81.424	-	Antitoxina HigA2 del sistema TA HigA2/HigB2	<i>Acinetobacter</i> spp.	90	100% (WP_000369781.1)
75	<i>higB2</i>	82.009	81.689	-	Toxina HigB2 del sistema TA HigA2/HigB2	<i>Acinetobacter</i> spp.	106	100% (WP_058971762.1)
76	<i>orf76</i>	82.176	82.436	+	Proteína hipotética	<i>A. ursingii</i> UMB1319	86	100% (PMC96545.1)
77	<i>orf77</i>	82.575	82.889	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	104	100% (WP_058971764.1)
78	<i>tnpA</i>	83.442	84.773	+	Transposasa	<i>A. ursingii</i> UMB1319	439	100% (PMC96541.1)
79	<i>ΔtnpA</i>	85.025	84.888	-	Transposasa trunca	<i>A. baumannii</i> AC002	45	100% (PCN85022.1)
80	<i>sdhC</i>	85.123	85.497	+	Succinato deshidrogenasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	124	100% (WP_005005993.1)
81	<i>grxC</i>	87.415	87.143	-	Glutaredoxina 3	<i>Acinetobacter</i> spp.	90	100% (WP_005005995.1)
82	<i>fnr</i>	88.615	87.869	-	Reductasa de la familia de las Flavodoxinas NADPH	<i>Acinetobacter</i> spp.	248	100% (WP_002118292.1)
83	<i>yuiH</i>	89.255	88.608	-	Sulfito oxidasa	<i>A. nosocomialis</i> WC-487	215	100% (EKU58237.1)
84	<i>orf84</i>	89.678	90.148	+	Tiol-disulfuro isomerasa	<i>P. aeruginosa</i> HIAE_PA13	156	100% (PTZ28688.1)
85	<i>orf85</i>	91.257	90.826	-	Proteína de unión al hemo	<i>K. pneumoniae</i> MGH90	146	99% (KMG76643.1)
86	<i>qor5</i>	92.343	91.330	-	Proteína bifuncional: alcohol deshidrogenasa; quinona oxidoreductasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	337	100% (WP_002118279.1)
87	<i>orf87</i>	92.419	92.586	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> sp. 694762	55	100% (EXI09684.1)
88	<i>corA</i>	93.759	92.791	-	Transportador de Magnesio y cobalto CorA	<i>Acinetobacter</i> spp.	322	100% (WP_011979111.1)
89	<i>gstA</i>	94.460	93.756	-	Glutación S-transferasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	234	100% (WP_003464969.1)

90	<i>msrA2</i>	95.140	94.601	-	Sulfóxido reductasa de S-metionina MsrA2	<i>Acinetobacter</i> spp.	179	100% (WP_003464967.1)
91	<i>selR-like</i>	95.585	95.142	-	Sulfóxido reductasa de R-metionina tipo-SelR	<i>Acinetobacter</i> spp.	147	100% (WP_003464965.1)
92	<i>orfA</i>	96.909	96.106	-	Proteína accesoria de la transposición	<i>Acinetobacter</i> spp.	267	100% (WP_010454871.1)
93	<i>orfB</i>	98.392	96.902	-	Transposasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	499	100% (WP_024012635.1)
94	<i>traM</i>	99.024	98.590	-	Proteína TraM del SST4	Uncultured bacterium pQKH54	144	96% (CAJ43281.1)
95	<i>traL</i>	99.761	99.036	-	Proteína TraL del SST4	Uncultured bacterium pQKH54	241	97% (CAJ43361.1)
96	<i>traK</i>	100.189	99.761	-	Proteína TraK de unión al <i>oriT</i> , asociada al SST4	Uncultured bacterium pQKH54	142	91% (CAJ43360.1)
97	<i>traJ</i>	100.535	100.891	+	Proteína TraJ de unión al <i>oriT</i> , asociada a la conjugación	Uncultured bacterium pQKH54	118	98% (CAJ43359.1)
98	$\Delta traI$	100.926	103.001	+	Relaxasa TraI truncada	Uncultured bacterium pQKH54	691	92% (CAJ43356.1)
99	$\Delta tnpA$	103.065	103.211	+	Transposasa truncada	<i>Acinetobacter</i> spp.	48	100% (WP_005028587.1)
100	<i>tnpA</i>	103.208	104.140	+	Transposasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	310	99% (WP_002114401.1)
101	<i>gshR</i>	105.688	104.336	-	Glutación reductasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	450	100% (WP_002122354.1)
102	$\Delta tnpA$	106.399	105.767	-	Transposasa truncada	<i>A. radioresistens</i> 50v1	228	100% (PKD86752.1)
103	<i>orfA</i>	106.505	107.074	+	Primera parte de la transposasa	<i>Acinetobacter</i> sp. LCT-H3	189	100% (OIJ35007.1)
104	<i>orfB</i>	107.161	107.595	+	Segunda parte de la transposasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	144	100% (WP_000780881.1)
105	<i>higB</i>	108.242	108.436	+	Toxina HigB del sistema TA HigA/HigB	<i>Acinetobacter</i> spp.	118	100% (WP_004668307.1)
106	<i>higA</i>	108.429	108.731	+	Antitoxina HigA del sistema TA HigA/HigB	<i>Acinetobacter</i> spp.	100	100% (WP_001140620.1)
107	<i>tnpA</i>	108.852	110.003	+	Transposasa	<i>A. ursingii</i> UMB1319	383	100% (WP_058971770.1)
108	$\Delta tnpA$	110.378	110.764	+	Transposasa truncada	<i>A. baumannii</i> ACM-14	128	99% (WP_107681061.1)
109	$\Delta phoA$	111.604	110.768	-	Fosfatasa alcalina truncada	<i>A. ursingii</i> UMB1319, <i>A. nosocomialis</i> 2010S01-197	278	100% (WP_043972776.1)
110	<i>parB</i>	112.652	111.753	-	Proteína ParB implicada en la segregación plasmídica	<i>Acinetobacter</i> spp.	299	99% (WP_016165153.1)
111	<i>parA</i>	113.447	112.671	-	Proteína ParB implicada en la segregación plasmídica	<i>Acinetobacter</i> spp.	258	100% (WP_004942653.1)

^aEl algoritmo BlastP se utilizó para buscar similitudes de proteínas en las bases de datos del NCBI (GenBank). El número de acceso de la proteína de mayor identidad aminoacídica se indica entre paréntesis.

Tabla A.4. Genes codificantes del plásmido pAbe229-15

Orden	Gen/ORF	Localización (nucleótidos)		Hebra de ADN	Proteínas con mayor similitud de secuencia en la base de datos de NCBI (según BlastP)			
		Inicio	Final		Función asignada	Origen (microorganismo y/o plásmido)	Proteína más relacionada	
							Longitud (aminoácidos)	Identidad aminoacídica ^a (número de acceso)
1	<i>repB</i>	501	1.388	+	Proteína implicada en la replicación plasmídica	<i>Acinetobacter</i> spp.	295	100% (WP_012780181.1)
2	<i>orf2</i>	1.465	2.022	+	Proteína hipotética	pAB-ML, <i>A. baumannii</i>	185	97% (AKT73129.1)
3	<i>yddG</i>	3.125	2.220	-	Transportador de la superfamilia DMT	p2ZQ4, <i>A. baumannii</i>	301	97% (PST50000.1)
4	<i>proP</i>	4.430	3.138	-	Transportador ProP de L-Prolina/Glicina	<i>A. calcoaceticus</i> / <i>A. baumannii</i> complex	430	99% (WP_000794338.1)
5	<i>cre</i>	5.726	4.488	-	Creatinasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	412	100% (WP_001094922.1)
6	<i>glxA</i>	6.802	5.843	-	Regulador transcripcional GlxA	<i>A. nosocomialis</i>	322	100% (OID34742.1)
7	<i>higA2</i>	765	7.378	-	Antitoxina HigA2 del sistema TA HigA2/HigB2	<i>Acinetobacter</i> spp.	90	100% (WP_000369780.1)
8	<i>higB2</i>	7.963	7.643	-	Toxina HigB2 del sistema TA HigA2/HigB2	<i>A. baumannii</i> JX101	105	99% (PUV04638.1)
9	<i>orf9</i>	8.347	8.15	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	65	100% (WP_000476222.1)
10	<i>orf10</i>	8.641	8.414	-	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	75	99% (WP_000921865.1)
11	<i>cspE</i>	8.954	8.739	-	Proteína de "shock por frío" CspE	<i>Acinetobacter</i> spp.	71	100% (WP_000071892.1)
12	<i>orf12</i>	9.800	10.186	+	Proteína hipotética	<i>A. bereziniae</i> CHI-40-1	128	99% (WP_042088600.1)
13	<i>orf13</i>	10.349	10.858	+	Proteína hipotética	<i>A. pittii</i> UKK-0538	170	86% (OCY73692.1)
14	<i>orf14</i>	12.725	11.250	-	Proteína hipotética	<i>A. pittii</i> UKK-0538	491	97% (OCY73691.1)
15	<i>orf15</i>	13.121	13.879	-	Proteína hipotética	pMMCU1, <i>A. calcoaceticus</i>	252	100% (YP_003090211)
16	<i>mobA</i>	14.183	15.352	+	Relaxasa de la familia MobA/MobL	<i>Acinetobacter</i> spp.	389	100% (WP_012846858.1)

^aEl algoritmo BlastP se utilizó para buscar similitudes de proteínas en las bases de datos del NCBI (GenBank). El número de acceso de la proteína de mayor identidad aminoacídica se indica entre paréntesis.

Tabla A.5. Genes codificantes del plásmido pAbe229-9

Orden	Gen/ORF	Localización (nucleótidos)		Hebra de ADN	Proteínas con mayor similitud de secuencia en la base de datos de NCBI (según BlastP)			
		Inicio	Final		Función asignada	Origen (microorganismo y/o plásmido)	Proteína más relacionada	Identidad aminoacídica ^a (número de acceso)
1	<i>repB</i>	501	1.436	+	Proteína implicada en la replicación plasmídica	<i>A. pittii</i> PR331	311	100% (OTM21916.1)
2	<i>orf2</i>	1.467	2.051	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> sp. 243_ASPC	182	100% (WP_048766125.1)
3	<i>secC</i>	3.055	2.258	-	Proteína quelante de zinc SecC	<i>A. ursingii</i> blaTEM-116	279	99% (PPZ93229.1)
4	<i>orf4</i>	3.566	3.069	-	Proteína hipotética	<i>A. ursingii</i> blaTEM-116	165	100% (PPZ93230.1)
5	<i>splT</i>	3.848	4.144	+	Toxina SplT del sistema TA SplT/SptA	<i>A. johnsonii</i> SH046	98	100% (EEY94869)
6	<i>splA</i>	4.137	4.445	+	Antitoxina SplA del sistema TA SplT/SptA	<i>Acinetobacter</i> spp.	104	100% (WP_005331448.1)
7	<i>orf7</i>	4.528	4.863	+	Proteína hipotética	<i>A. baumannii</i> ABBL059, <i>A. pittii</i> St-14379-92	111	100% (WP_032866032.1)
8	<i>orf8</i>	4.907	5.092	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> spp.	59	100% (WP_001231652.1)
9	<i>doc</i>	5.095	5.475	+	Toxina Doc del sistema TA tipo II	<i>Acinetobacter</i> spp.	128	100% (WP_000053135.1)
10	<i>ymdB</i>	6.028	5.477	-	O-acetil-ADP-ribosa desacetilasa	<i>Acinetobacter</i> spp.	183	100% (WP_005401799.1)
11	<i>orf11</i>	6.765	6.037	-	Proteína hipotética	<i>A. baumannii</i> ABBL059, <i>A. pittii</i> St-14379-92	232	100% (WP_057692832.1)
12	<i>orf12</i>	7.644	6.883	-	Proteína hipotética	<i>A. pittii</i> PR331	253	100% (OTM21914.1)
13	<i>mobA</i>	7.948	9.120	+	Relaxasa de la familia MobA/MobL	<i>Acinetobacter</i> sp. 243_ASPC	390	100% (WP_048765066.1)

^aEl algoritmo BlastP se utilizó para buscar similitudes de proteínas en las bases de datos del NCBI (GenBank). El número de acceso de la proteína de mayor identidad aminoacídica se indica entre paréntesis.

Tabla A.6. Genes codificantes del plásmido pAbe229-4

Orden	Gen/ORF	Localización (nucleótidos)		Hebra de ADN	Proteínas con mayor similitud de secuencia en la base de datos de NCBI (según BlastP)			
		Inicio	Final		Función asignada	Origen (microorganismo y/o plásmido)	Proteína más relacionada	
							Longitud (aminoácidos)	Identidad aminoacídica ^a (número de acceso)
1	orf1	1.217	714	-	Proteína de unión al ADN	<i>A. venetianus</i> LUH5627	167	95% (KXZ63025.1)
2	orf2	1.518	1.721	-	Proteína hipotética	<i>A. parvus</i> NIPH 1103	67	96% (ENU34776.1)
3	<i>relE</i>	2.080	1.748	-	Toxina RelE del sistema TA RelE/RelB	<i>Acinetobacter</i> sp. CIP 102129	110	98% (ENU87589.1)
4	<i>relB</i>	2.333	2.052	-	Antitoxina RelB del sistema TA RelE/RelB	<i>Acinetobacter</i> sp. WCHA60	93	97% (WP_068975482.1)
5	orf5	2.423	2.737	+	Proteína hipotética	<i>Candidatus Buchananbacteria</i> RBG_13_36_9	104	44% (OGY42406.1)
6	<i>rimI</i>	3.722	3.096	-	N-acetiltransferasa de la familia GNAT	<i>A. pittii</i> YMC2010/8/T347	208	59% (AQV14548.1)
7	orf7	3.885	3.688	-	Proteína hipotética	<i>A. pittii</i> YMC2010/8/T348	65	66% (WP_078219821.1)

^aEl algoritmo BlastP se utilizó para buscar similitudes de proteínas en las bases de datos del NCBI (GenBank). El número de acceso de la proteína de mayor identidad aminoacídica se indica entre paréntesis.

Tabla A.7. Genes codificantes del plásmido pAbe229-1

Orden	Gen/ORF	Localización (nucleótidos)		Hebra de ADN	Proteínas con mayor similitud de secuencia en la base de datos de NCBI (según BlastP)			
		Inicio	Final		Función asignada	Origen (microorganismo y/o plásmido)	Proteína más relacionada	
							Longitud (aminoácidos)	Identidad aminoacídica ^a (número de acceso)
1	orf1	56	220	+	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter</i> sp. ACNIH2	54	50% (AUX87537.1)
2	orf2	893	1.105	+	Proteína hipotética	<i>Chlamydia trachomatis</i> H17IMS	70	53% (CRH77953.1)

^aEl algoritmo BlastP se utilizó para buscar similitudes de proteínas en las bases de datos del NCBI (GenBank). El número de acceso de la proteína de mayor identidad aminoacídica se indica entre paréntesis.